

# Das Dispaseautolyse-induzierende Protein von *Streptomyces mobaraensis*.

Struktur, Katalysemechanismus und Glutaminbindestellen für  
die Modifikation durch mikrobielle Transglutaminase.



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*

**Dissertation**  
von **David Alexander Fiebig**  
aus Darmstadt

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Kolmar  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer

Darmstadt 2019

---

Fiebig, David Alexander: Das Dispaeseautolyse-induzierende Protein von *Streptomyces mobaraensis*.  
Struktur, Katalysemechanismus und Glutaminbindestellen für die Modifikation durch mikrobielle  
Transglutaminase.

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-81504

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2019

Veröffentlicht unter lediglich die vom Gesetz vorgesehenen Nutzungsrechte gemäß UrhG.

Tag der Einreichung: \_\_\_\_\_

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_



---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Streptomyceten.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Die mikrobielle Transglutaminase <i>Sm</i>-TG .....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Anwendung und Funktion .....	7
2.2.2. Substratspezifität .....	12
2.2.3. Intrinsische Substratproteine.....	13
<b>2.3. Das Dispaseautolyse-induzierende Protein DAIP.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. M4-Metalloproteasen .....</b>	<b>17</b>
2.4.1. Verbreitung/Vorkommen.....	17
2.4.2. Struktur und Katalysemechanismus .....	18
2.4.3. Inhibition von M4-Metalloproteasen .....	21
<b>2.5. Zielsetzung .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Materialien .....</b>	<b>24</b>
3.1.1. Chemikalien.....	24
3.1.2. Kits .....	25
3.1.3. Mikroorganismen.....	25
3.1.4. Antikörper .....	25
3.1.5. Enzyme, Proteine und Molekulargewichtsstandards .....	25
3.1.6. Gene und Vektoren.....	27
3.1.7. Oligonukleotide (Primer) .....	28
3.1.8. Puffer und Lösungen .....	30
3.1.9. Kultivierungsmedien .....	31
3.1.10. Chromatographiesäulen und -materialien .....	32
3.1.11. Geräte.....	33
3.1.12. Verbrauchsmaterialien.....	34
<b>3.2. Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.2.1. Sterilisation .....	34
3.2.2. Bestimmung der Zelldichte .....	34
3.2.3. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	35
3.2.4. Submerskultivierung von <i>E. coli</i> zur Proteinproduktion.....	34
3.2.5. Submerskultivierung von <i>S. mobaraensis</i> zur Proteinproduktion.....	35
3.2.6. Zellernte .....	36
3.2.7. Ultraschall-Zellaufschluss.....	36

<b>3.3. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>36</b>
3.3.1. Isolation von Plasmid-DNA .....	36
3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	36
3.3.3. Agarose-Gelelektrophorese .....	37
3.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	37
3.3.5. Restriktion von DNA .....	39
3.3.6. Ligation von Plasmid-DNA .....	39
3.3.7. Hitzeschock-Transformation .....	40
3.3.8. DNA-Sequenzierung.....	40
<b>3.4. Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>40</b>
3.4.1. Affinitätschromatographien.....	40
3.4.2. Ionenaustauschchromatographie (ion exchange, IEX) .....	43
3.4.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) .....	43
3.4.4. Größenausschlusschromatographie (GPC).....	44
3.4.5. Konzentrierung von Proteinlösungen .....	45
3.4.6. Proteinfällung.....	45
3.4.7. Lyophilisation .....	45
3.4.8. Dialyse.....	45
3.4.9. Enzymatische Alkylierung von <i>Sm</i> -TG .....	46
3.4.10. Reduktion von Disulfidbrücken .....	46
<b>3.5. Proteinanalytische Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.5.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	46
3.5.2. Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie).....	48
3.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.5.4. Coomassie-Brillantblau-Färbung von Polyacrylamid-Gelen.....	49
3.5.5. Western Blot.....	49
3.5.6. Zymographie .....	51
3.5.7. Kinetische Analyse von <i>Sm</i> -TG vermittelter Proteinmodifikation .....	51
3.5.8. Hydroxamsäure- <i>Assay</i> zur Bestimmung der Enzymaktivität von <i>Sm</i> -TG .....	52
3.5.9. Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit Azocasein .....	53
3.5.10. Aktivitätstest für P1'-Endoproteasen mit Furfurylacryloyl-Gly-Phe-amid ( <i>FaGfa-Assay</i> ).....	54
3.5.11. Aktivitätstest für P1'-Endoproteasen mit Dabcyl-Ser-Phe-EDANS ( <i>DabSFans-Assay</i> ) .....	54
3.5.12. Fluoreszenzpolarisations (FP)- <i>Assay</i> zur Ermittlung kinetischer Parameter von DAIP .....	55
3.5.13. Proteaseentfaltungs- und Hydrolyse-Studien mit SYPRO-Orange.....	57
3.5.14. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	57
3.5.15. Schmelzpunktbestimmung über intrinsische Fluoreszenz.....	58
3.5.16. Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse .....	59

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1. Struktur von DAIP und Charakterisierung der Glutaminbindestellen für die Modifikation durch <i>Sm</i>-TG .....</b>	<b>60</b>
4.1.1. Gentechnische Vorarbeiten zur rekombinanten Produktion von DAIP und dessen Varianten .....	60
4.1.2. Produktion und Reinigung von rDAIP .....	62
4.1.3. Produktion und Reinigung von <i>Sm</i> -TG .....	66
4.1.4. Enzymatische Alkylierung von <i>Sm</i> -TG .....	68
4.1.5. Ermittlung der <i>Sm</i> -TG-Glutaminbindestellen von DAIP .....	69
4.1.6. Charakterisierung der <i>Sm</i> -TG-Glutaminbindestellen von DAIP .....	70
4.1.7. Aufklärung der Tertiärstruktur von DAIP .....	72
4.1.8. <i>Sm</i> -TG-Glutamin-Umsatz in Relation zur molekularen Umgebung .....	73
<b>4.2. Aufklärung des Katalyse-Mechanismus von DAIP und Identifikation neuer Zielproteasen..</b>	<b>77</b>
4.2.1. Gentechnische Vorarbeiten zur rekombinanten Produktion von aktiven und nicht-funktionellen M4-Metalloproteasen .....	77
4.2.2. Produktion und Reinigung von M4-Metalloproteasen.....	81
4.2.3. Produktion, Reinigung und Prozessierung nicht-funktioneller M4-Metalloproteasen.....	88
4.2.4. Charakterisierung und Inhibierung von rBacillolysin .....	94
4.2.5. <i>In-vitro</i> -Propeptid-Prozessierung von M4-Metalloproteasen .....	97
4.2.6. DAIP-Protease-Interaktionsstudien .....	100
4.2.7. Konformationelle Veränderungen von M4-Metalloproteasen durch DAIP .....	104
4.2.8. Fragmentierungsstudien von M4-Metalloproteasen mit DAIP .....	107
4.2.9. Kinetisches Model des DAIP-Katalyse-Mechanismus .....	112
4.2.10. Strukturaufklärung eines Komplexes von DAIP mit dem C-terminalen Fragment von Thermolysin ....	114
4.2.11. Wirkungsprofile diverser DAIP-Varianten auf M4-Metalloproteasen.....	117
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>124</b>
<b>5.1. Strukturelle und biochemische Charakterisierung der Glutaminbindestellen von DAIP.....</b>	<b>124</b>
<b>5.2. M4-Metalloproteasen und der Mechanismus des DAIP .....</b>	<b>128</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>137</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>150</b>
7.1. Gensequenzen.....	150
7.2. Plasmidkarten .....	152
7.3. Zusätzliche Abbildungen .....	153
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>158</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>161</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>162</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>165</b>
<b>12. Lebenslauf (Übersicht des Bildungswegs) .....</b>	<b>167</b>
<b>13. Erklärungen .....</b>	<b>168</b>

---

## 1. Zusammenfassung

---

Die Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* (*Sm*-TG) ist ein wichtiges Enzym für die Vernetzung und Modifikation von Proteinen und gewann dadurch in den letzten Jahren vor allem im Bereich der zielgerichteten Konjugation an Bedeutung. Das Dispersautolyse-induzierende Protein DAIP stellt das erste physiologische Substrat von *Sm*-TG dar. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war unter anderem die Aufklärung der Tertiärstruktur sowie die Charakterisierung des DAIP hinsichtlich seiner Glutamin-Substrateigenschaften für *Sm*-TG. Die Primärstruktur von DAIP enthält insgesamt 5 potentielle Glutamine und 10 Lysine für die *Sm*-TG-vermittelte Transferasereaktion. Für die Untersuchung wurde zunächst ein Produktionsverfahren zur Herstellung von rekombinantem DAIP in *E. coli* entwickelt. Die Produktion von glutamindefizienten DAIP-Varianten erfolgte jeweils durch Austausch von vier der insgesamt fünf vorhandenen Glutamine gegen Asparagin über ortsgerichtete Mutagenese. Die enzymvermittelte Konjugation von Monobiotinylcadaverin zeigte eine Präferenz von *Sm*-TG für die DAIP-Glutamine in der Reihenfolge Gln39 >> Gln298 > Gln345 ~ Gln65 >> Gln144. Es konnte gezeigt werden, dass die Spezifität und Effizienz von *Sm*-TG primär von der Flexibilität des Substratglutamins (*Loop* >>  $\beta$ -Faltblatt) und von der Aminosäurezusammensetzung der direkten molekularen Umgebung (klein unpolar >> voluminös > geladen) beeinflusst wird. Aufgrund fehlender Homologie zu den bisher größtenteils über Peptide abgeleiteten *Sm*-TG-Glutamin-Konsensussequenzen lieferte DAIP vor allem interessante Einblicke in die übergeordneten strukturellen Voraussetzungen des enzymatischen Umsatzes von Substratproteinen. In der Struktur des *seven-bladed  $\beta$ -propeller* DAIP befinden sich die präferierten Glutamine gemeinsam gruppiert auf der Oberseite des trapezförmigen Proteins und legt damit eine zielgerichtete Vernetzung von DAIP nach Selbstassemblierung in der bakteriellen Zellwand durch *Sm*-TG nahe. Auf Grundlage der biochemischen und strukturellen Daten des ersten physiologischen *Sm*-TG-Substrats konnten so neue Einblicke in die Determinanten der enzymvermittelten Modifikation, Spezifität und Effizienz gewonnen werden.

DAIP besitzt über die *Sm*-TG-Substrateigenschaften hinaus die bisher noch nicht beschriebene Fähigkeit zur Inaktivierung neutraler Metalloproteasen durch Eigenhydrolyse. Das Fehlen einer katalytischen Domäne führte zu der Annahme, dass DAIP durch strukturelle Modifikation der Metalloprotease die Autolysebereitschaft erhöht. Der Nachweis und die Isolation von Proteinkomplexen bestehend aus DAIP und Thermolysin, Pseudolysin oder nicht-funktionellem rBacilolysin-E138A unterstützten diese Annahme vor allem aufgrund der hohen Affinität der Bindung. Der Einfluss auf die Konformation ließ sich dabei auch über die DAIP-vermittelte Inhibierung von Thermolysin und Pseudolysin nachweisen, wohingegen Bacilolysin und Aureolysin direkt autolysierten. Eine ähnlich schnelle Hydrolyse von Thermolysin konnte erst nach Zugabe amphiphiler Moleküle beobachtet werden, welche potentiell die induzierten strukturellen Modifikationen verstärkten. Interessanterweise erlaubte der Farbstoff SYPRO-Orange die Verfolgung des schnellen Autolyse/Hydrolyse-Prozesses, welcher zu Beginn durch einen

---

steilen Anstieg der Fluoreszenz gekennzeichnet war. DAIP vermittelte weiterhin den proteolytischen Abbau von rBacillolysin-E138A-FITC durch Trypsin, was sich durch eine lineare Abnahme der Fluoreszenzpolarisation ausdrückte. Mithilfe dieser Daten war es möglich, ein kinetisches Modell des DAIP-Mechanismus zu erstellen, welches (I) die DAIP-Protease-Komplexbildung, (II) die strukturelle Modifikation der Protease und letztlich (III) die Hydrolyse umfasst. Dieser Prozess konnte zudem durch Kristallisation von DAIP mit Thermolysin bestätigt werden. Die strukturelle Überlagerung des Komplexes mit Thermolysin implizierte eine konformationelle Veränderung bei der Bindung an DAIP. Die daraus abgeleiteten DAIP-Varianten zeigten, dass Komplexbildung, Proteaseinhibierung und Transformation in einen autolysesensitiven Zustand nicht zwangsweise miteinander verknüpft sind und ermöglichten die Identifikation der an der Modifikation beteiligten Aminosäuren. Die identifizierten Zielproteasen des DAIP, darunter bekannte Pathogenitätsfaktoren von Bakterien, eröffnen neue Ansätze in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Das in dieser Arbeit entwickelte Verständnis, wie DAIP Metalloproteasen inaktiviert, liefert dazu einen substantiellen Beitrag.

Große Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Fachzeitschriften publiziert.

#### **Publikationen:**

**Fiebig, D.,** Storka, J., Roeder, M., Meyners, C., Schmelz, S., Blankenfeldt, W., Scrima, A., Kolmar, H. & Fuchsbauer, H. L. (2018) **Destructive twisting of neutral metalloproteases: the catalysis mechanism of the Dispase autolysis-inducing protein from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40487**, *FEBS J.* **285**, 4246-4264.

**Fiebig, D.,** Schmelz, S., Zindel, S., Ehret, V., Beck, J., Ebenig, A., Ehret, M., Froels, S., Pfeifer, F., Kolmar, H., Fuchsbauer, H. L. & Scrima, A. (2016) **Structure of the Dispase Autolysis-inducing Protein from *Streptomyces mobaraensis* and Glutamine Cross-linking Sites for Transglutaminase**, *J Biol Chem.* **291**, 20417-26.

#### **weitere Publikationen:**

Zindel, S., Ehret, V., Ehret, M., Hentschel, M., Witt, S., Krämer, A., **Fiebig, D.,** Jüttner, N., Fröls, S., Pfeifer, F. & Fuchsbauer, H. L. (2016) **Involvement of a Novel Class C Beta-Lactamase in the Transglutaminase Mediated Cross-Linking Cascade of *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847**, *PloS One.* **11**, e0149145.

---

## 2. Einleitung

---

### 2.1. Streptomyceten

Als Streptomyceten werden grampositive Bakterien bezeichnet, welche zur Ordnung der heterogenen Actinomyceten gehören. <sup>[1, 2]</sup> Sie sind fakultativ aerobe, chemoorganotrophe Eubakterien, deren Lebensraum meist, aber nicht ausschließlich, im Erdreich zu finden ist, und zeichnen sich durch mehrere Besonderheiten aus. <sup>[3-8]</sup> Mit ihren über 600 bisher beschriebenen Arten und Unterarten stellen sie die größte taxonomische Gruppe in der Domäne *Bacteria* dar. <sup>[1, 9]</sup> Eines der charakteristischen Merkmale ist ihr verzweigt-filamentöses Wachstum, welches dem Mycel von Pilzen ähnelt. Es trägt diese Bezeichnung jedoch aufgrund seines in der vegetativen Phase unseptierten *Coenocytiums*, durch welches die Hyphen zahlreiche Kopien der genomischen DNA besitzen und quasi „vielkernig“ erscheinen. <sup>[10, 11]</sup>

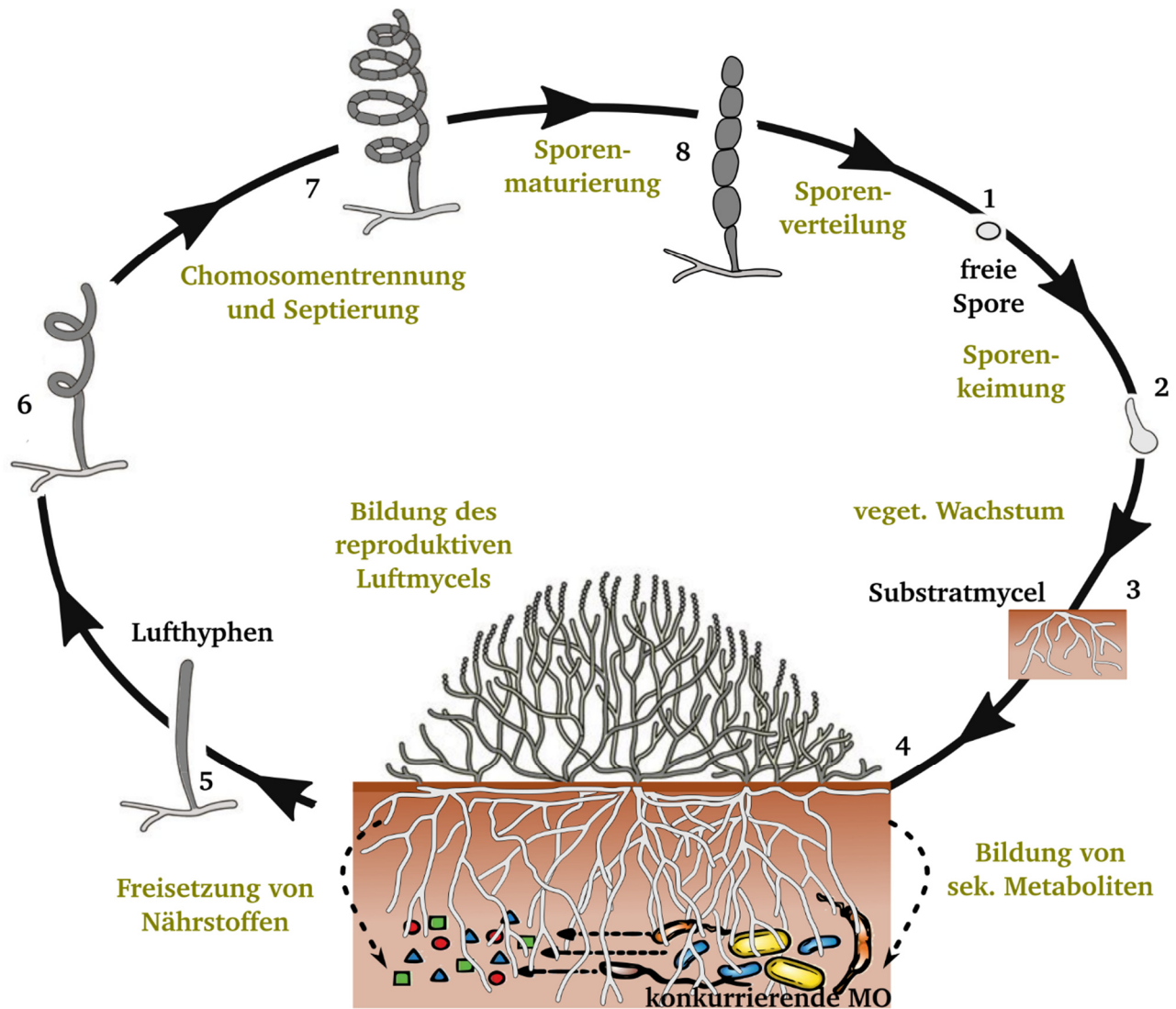
Ein weiteres Merkmal liegt in der Größe des Genoms, welches mit 9-12 Mbp mehr als doppelt so groß ist wie bspw. das von *Mycobacterium tuberculosis*, das aus 4.4 Mbp besteht. <sup>[12-15]</sup> Dieses für Bakterien sehr große Genom liegt im Gegensatz zu dem der meisten anderen Mitgliedern dieser Ordnung linear vor. Eine große Anzahl regulatorischer Gene erlaubt es zudem, auf äußere Stimuli und Stress zu reagieren. Die besondere Art der Informationserhaltung ermöglicht jedoch eine hohe intrazelluläre Fluidität und Plastizität zur schnellen Adaption an sich ändernde Lebensbedingungen, was sich auch in einem erweiterten Substratspektrum widerspiegelt. Dafür wird jedoch eine höhere Anfälligkeit für Exonukleasen in Kauf genommen. <sup>[12, 16]</sup> Dies lässt sich auch aus dem Aufbau des Genoms ableiten, in dem die lebensnotwendigen *housekeeping*-Gencluster, wie die *bld*- und *whi*-Regulons, im Zentrum und die zur Synthese von Sekundärmetaboliten benötigten Gene in den Armen des Chromosoms anzutreffen sind. <sup>[17]</sup> Die meisten dieser Gene wurden über konjugativen DNA-Transfer aufgenommen. <sup>[18]</sup> Der leicht modrige Geruch von frisch aufgebrochener Erde bspw. ist auf einen dieser für Streptomyceten typischen Sekundärmetaboliten, Geosmin, zurückzuführen. <sup>[19]</sup>

Der große Bekanntheitsgrad von Streptomyceten basiert jedoch nicht nur auf der Produktion ätherischer Öle, sondern auch auf der Vielzahl niedermolekularer bioaktiver Substanzen sowie einer Fülle an hydrolytischen Enzymen, die sie im Laufe ihrer Entwicklung synthetisieren und sezernieren. <sup>[20, 21]</sup>

Streptomyceten durchlaufen einen vergleichsweise komplexen Lebenszyklus, welcher sich in drei distinkte Differenzierungsstadien unterteilen lässt und durch Substratmycel-, Luftmycel- und Sporenbildung seine Ausprägung erfährt (Abb. 2.1). <sup>[22]</sup> Als Eubakterien besitzen Streptomyceten, trotz fehlendem Zellkern, hinsichtlich ihrer Komplexität und Differenzierungsfähigkeit ähnliche Eigenschaften wie Eukaryonten. <sup>[23, 24]</sup>

Wenn die äußeren Bedingungen optimal sind, beginnt der Lebenszyklus der Streptomyceten mit dem Auskeimen einer Exospore über ein bis zwei Keimschläuche, welche direkt in ein verzweigtes hyphenartiges Substratmycel übergehen. <sup>[25]</sup> Durch das vielschichtige und nicht nur oberflächliche Wachstum kann das Bakterium zudem das zur Verfügung stehende Substrat effizienter nutzen und verschafft sich damit auch einen Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen unbeweglichen

Mikroorganismen im Habitat. <sup>[26]</sup> In dieser Wachstumsphase werden zahlreiche hydrolytische Enzyme sezerniert, um Polymere wie Chitin und Cellulose sowie andere Biomasse abzubauen. Diese werden so als Nährstoff nutzbar gemacht und können in Form von Speicherstoffen wie Glykogen für die spätere Biosynthese akkumuliert werden. <sup>[27]</sup> Weiterhin zählen dazu auch eine Vielzahl an meist Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen zur Stickstofferschließung. <sup>[28]</sup> Das Wachstum findet ausschließlich an den Spitzen der Hyphen durch Zellwandausdehnung statt.



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Streptomyces.** Der Lebenszyklus beginnt mit dem Keimen der Spore (1, 2), welche sich zum verzweigten Substratmycel entwickelt (3). Durch äußere Stimuli, wie Nährstoffmangel, setzt zum Aufbau des Luftmycels (4) die programmierte Lyse eines Teils des Substratmycels unter Freisetzung von Nährstoffen ein. Dies geht einher mit der Produktion von Sekundärmetaboliten zum Schutz vor durch die Nährstoffe angelockten Mikroorganismen (MO). Die Lufthyphen durchlaufen weitere Differenzierungsschritte zur abschließenden Bildung der reproduktiven Sporen (5-8). Nach Barka *et al.*, 2016. <sup>[29]</sup>

Beim Auftreten eines äußeren Stimulus, der bspw. durch den Mangel eines essentiellen Nährstoffs hervorgerufen sein kann, setzt das zweite Differenzierungsstadium in der Entwicklung von Streptomyces ein. Bei diesem erheben sich Lufthyphen spiralförmig aus dem Substratmycel in die Luft, welche durch das oberflächenaktive Tensid SapB unterstützt werden und mit einer hydrophoben Proteinschicht bestehend aus Chaplinsen und Rodlinen bedeckt sind. <sup>[30-32]</sup> Bei der Art



---

*Streptomyces mobaraensis*, die früher zur Gattung *Streptovercillium* zählte, bildet sich das Luftmycel hingegen in Form mehrschichtiger Dolden.

Der Übergang von Substrat- zum Luftmycel wird dabei im Wesentlichen von den *AdpA*-abhängigen *bld*-Genen gesteuert und geht mit der Expression und Sekretion einer ganzen Kaskade an Proteasen, Proteaseinhibitoren und weiteren Sekundärmetaboliten einher. <sup>[33]</sup> Diese stellen unter anderem die benötigten Ressourcen zum Aufbau der Lufthyphen durch kontrollierte Lyse des Substratmycels bereit und dienen der Abwehr anderer Mikroorganismen in der Umgebung. <sup>[34]</sup> Zu den bioaktiven niedermolekularen Substanzen zählen neben Antibiotika (Streptomycin, Chloramphenicol, Kanamycin), die heute mehr als die Hälfte der antibiotischen Medizinprodukte ausmachen, zahlreiche Wirkstoffe mit antifungalen (Blasticidin, Candicidin), antitumoralen (Borrelidin, Doxorubicin), antiviralen (Panosialin), immunsuppressiven (Hygromycin), herbiziden (Herbimyzin) bzw. insektiziden (Prodiginin) Eigenschaften. <sup>[29]</sup> Diese Wirkstoffe sind damit nicht nur von wissenschaftlichem, sondern auch von industriellem Interesse.

Am Ende des reproduktiven Lufthyphenwachstums unterzieht sich das lange, multigenomische Filament einer Septierung durch Einzug mehrerer Zellwände. Daraus resultieren Ketten einzelgenomischer Kompartimente, welche sich dann, durch Regulation über die *whi*-Gene, in reife Exosporen differenzieren und damit den Lebenszyklus schließen.

Jones und Kollegen konnten kürzlich eine weitere Entwicklungsstufe bei einigen Streptomyceten-Arten nachweisen, welche sie als „Erkundungsphase“ (Exploration) bezeichneten. Einmal mehr zeigt sich damit die große Interaktivität der grampositiven Eubakterien. <sup>[35]</sup> Diese vorher noch nicht beobachtete Differenzierungsform wird durch Interaktion mit Pilzen wie bspw. *Saccharomyces cerevisiae* ausgelöst. Sie äußert sich durch die Fähigkeit ein nicht-verzweigtes vegetatives Substratmycel zu bilden, mit dem die Streptomyceten verschiedenste Untergründe schnell überwinden und dabei das Areal „erkunden“. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Kommunikation mit räumlich weiter entfernten Streptomyceten über sog. flüchtige organische Verbindungen (VOC, volatile organic compounds) stattfindet.

Der komplexe Lebenszyklus von Streptomyceten lässt sich so vor allem auf Interaktionen, seien sie symbiotischer oder kompetitiver Natur, mit anderen koexistierenden Organismen zurückführen. Streptomyceten sind zwar hauptsächlich im feuchten Erdreich anzutreffen, jedoch können sie auch eine Vielzahl unterschiedlicher Lebensräume, von Frischwasser-Ökosystemen bis hin zu trockenen Wüstengebieten, besiedeln. <sup>[36-39]</sup> Neben den in Mehrheit vorhandenen mesophilen sind unter ihnen auch einige thermophile Vertreter, wie bspw. *S. thermonitrificans*, bekannt. <sup>[40]</sup> Durch die große Anzahl hydrolytischer und biotechnologisch relevanter Exoenzyme leisten Streptomyceten einen großen Beitrag an der Umformung, Mineralisierung und Solubilisierung organischer Stoffe innerhalb ihres Habitats. Zu diesen zählen unter anderem Amylasen, Cellulasen, Chitinasen, Ligninasen, Lipasen sowie Proteasen, welche teilweise an komplexen Differenzierungsvorgängen beteiligt sind.



---

Die Entwicklung einer Population in einem Ökosystem ist dabei an zahlreiche Einflüsse wie Nahrungsangebot, Temperatur, pH, Feuchtigkeit, Salinität und mikrobielle Zusammensetzung gekoppelt. Dass die Lebensgemeinschaft innerhalb eines Habitats nicht nur auf Konkurrenz, sondern auch auf Symbiose beruht, zeigt sich anhand der komplexen Interaktion der Streptomyceten mit anderen Mikroorganismen über *Quorum-sensing*- und *Quorum-quenching*-Moleküle eindrucksvoll. <sup>[41]</sup> Einige Vertreter gehen hierbei eine direkte Symbiose mit höheren multizellulären Lebewesen ein. <sup>[42-44]</sup> So gibt es Beispiele einer engen Kooperation von pilzkultivierenden Attini-Ameisen mit Streptomyceten, deren antimikrobielle Sekundärmetaboliten den Wirt und seine Kultur vor pathogenen Erregern schützen. <sup>[45]</sup> Weitere symbiotische Verhaltensweisen von Actinomyceten mit ähnlicher Zielrichtung sind auch von anderen Insekten wie Bienen, Wespen und Käfern bekannt. <sup>[46-49]</sup> Diese Form der sich gegenseitig unterstützenden Lebensweise ist dabei jedoch nicht nur auf das Insektenreich beschränkt, sondern lässt sich auch in der Pflanzenwelt wiederfinden. Dabei nutzen die Eubakterien das durch den Wirt bereitgestellte Nahrungsangebot und schützen diesen im Gegenzug durch Sekretion antibiotischer Substanzen, welche sich gegen Phytopathogene richten. <sup>[50]</sup>

Die meisten dieser Kommunen profitieren danach größtenteils von der Vielfalt sekretierter Metabolite der Streptomyceten, welche nicht nur der Abwehr mikrobieller Feinde des Wirts, sondern vor allem dem Selbstschutz dienen. Vor allem in Phasen der vegetativen Reproduktion und damit einhergehenden Lyse des Substratmycels herrscht um die freigesetzten Nährstoffe ein hoher Konkurrenzdruck durch die benachbarten Mikroorganismen. Zu diesen zählen unter den Bakterien vor allem Vertreter der grampositiven Gattung *Bacilli*, von denen *B. subtilis* der bisher am besten charakterisierte Interaktionspartner der Streptomyceten ist. <sup>[51]</sup>

Streptomyceten und *Bacilli* haben im Laufe der Evolution zahlreiche Methoden entwickelt, um auf die Anwesenheit des jeweils anderen zu reagieren. So konnte gezeigt werden, dass das oberflächenaktive Tensid Surfactin, welches *B. subtilis* zur Sporulation verwendet, wie auch Bacillaene, das Lufthyphenwachstum von *S. coelicolor* vollständig zum Erliegen bringen. <sup>[52-54]</sup> Vergleichbare Effekte konnten auch im Zusammenhang mit dem Lactonase-homologen Protein YtnP beobachtet werden. Dieses wird als Stressreaktion von *B. subtilis* auf Streptomycin gebildet und inaktiviert zudem die Signalwege, die den Streptomycet zur weiteren Antibiotikaproduktion anregen. <sup>[55]</sup> Auf der anderen Seite hat bspw. der *Streptomyces*-Stamm Mg1 mit Linearmycin und Chalcomycin A zwei niedermolekulare Substanzen entwickelt, die die unmittelbare Lyse seines *Bacillus*-Kontrahenten induzieren. <sup>[56, 57]</sup>

Neben den genannten Beispielen, welche direkt die Entwicklung, Verteidigung und Proliferation beeinflussen, findet ein Großteil der Interaktion auf enzymatischer Ebene über die Sezernierung zahlreicher Enzyme und entsprechender Inhibitoren statt. Zu den häufigsten Vertretern, welche bei Streptomyceten und *Bacilli* anzutreffen sind, zählen alkalische Serin- und neutrale Metalloproteasen.

---

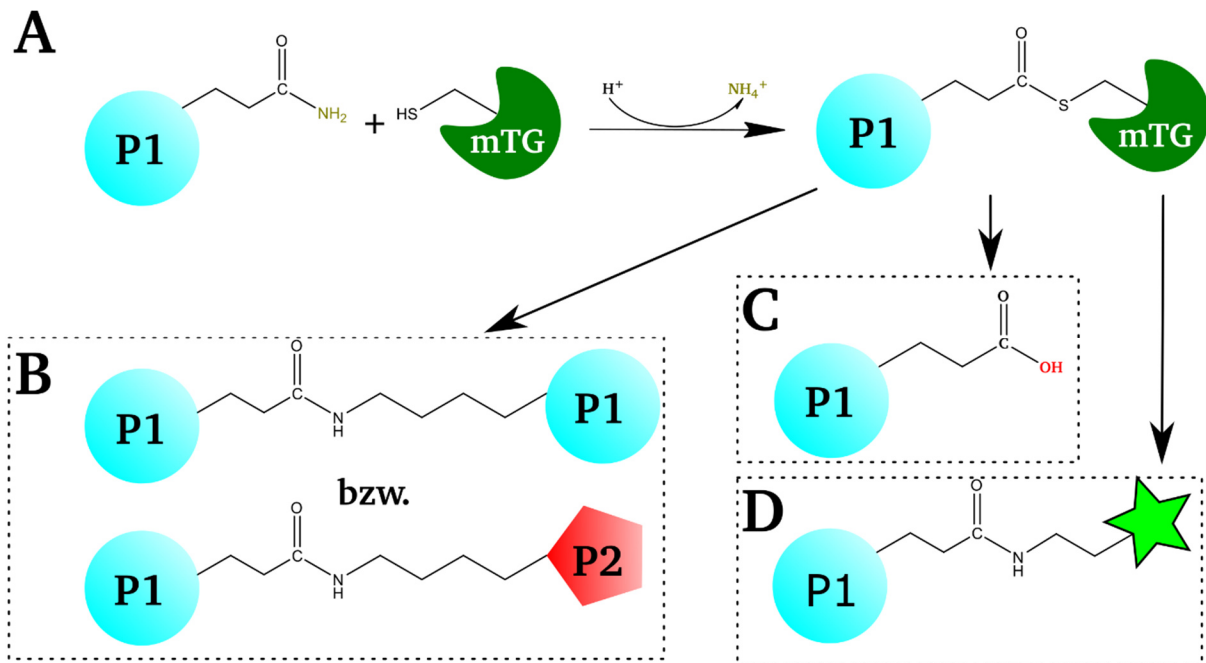
Diese Hydrolasen und deren Regulation weisen eine starke Beteiligung an der morphologischen Differenzierung der Organismen auf. Zu den bekanntesten Vertretern der *Bacillus*-Proteasen zählen hierbei Mitglieder der Subtilisin- (S8) und Thermolysin-Familie (M4), denen Streptomyceten unter anderem mit inhibitorischen Proteinen der SSI- (I16) und SMPI-Familien begegnen. <sup>[58-61]</sup>

Ein bisher kaum beschriebenes Protein ist das Dispaseautolyse-induzierende Protein (DAIP) von *S. mobaraensis*, welches Metalloproteasen der Thermolysin-Familie zerstört. <sup>[62]</sup> Dieses Protein wird vermutlich *in vivo* durch das Enzym Transglutaminase (mTG) aus dem gleichen Bakterium modifiziert und mit anderen Proteinen extrazellulär vernetzt. Sein antibiotisches Potential und die industrielle Bedeutung von Transglutaminase geben Anlass zu den Fragen, (i) wie DAIP die Autolyse von *Bacillus*-Proteasen verursacht und (ii) wie DAIP mit Transglutaminase interagiert. Die Antworten darauf sind wesentliche Gegenstände dieser Arbeit.

## **2.2. Die mikrobielle Transglutaminase *Sm*-TG**

### **2.2.1. Anwendung und Funktion**

Transglutaminasen (TGase; Proteinglutamin:Amin- $\gamma$ -Glutamyltransferase; EC 2.3.2.13) sind ubiquitär vorkommende Enzyme aus der Klasse der Transferasen, welche in Pflanzen, Tieren sowie Mikroorganismen zu finden sind und dabei eine Vielzahl physiologischer Prozesse regulieren. Am besten charakterisiert sind hierbei auf eukaryontischer Seite die humane Plasmatransglutaminase, Blutgerinnungsfaktor XIII, welche durch die Vernetzung von Fibrin zu unlöslichen Aggregaten maßgeblich an der Blutgerinnung beteiligt ist, sowie die Gewebetransglutaminase hTG2, die als Autoantigen für Zöliakie identifiziert wurde. <sup>[63-67]</sup> Durch ihre Beteiligung an Prozessen der Zell- und Gewebisdifferenzierung ist auch nachzuvollziehen, dass eine Fehlregulation zu einer Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder, wie bspw. neurodegenerative, Autoimmun- oder Infektionserkrankungen, führen kann. <sup>[68-71]</sup> Auf der prokaryontischen Seite gilt im Allgemeinen die mikrobielle Transglutaminase (mTG) von *Streptomyces mobaraensis* (*Sm*-TG, P81453) als der bekannteste Vertreter, welcher sich zudem in den letzten Jahren als vielseitiges Werkzeug in der Forschung und biotechnologischen Anwendung etabliert hat. <sup>[72, 73]</sup> Transglutaminasen katalysieren vorzugsweise die Acyl-Transfer-Reaktion zwischen  $\gamma$ -Carboxamid-Gruppen peptidgebundener Glutamin-Seitenketten (Acyl-Donor, Q-Substrat) und einer Vielzahl primärer Amine (Acyl-Akzeptor). Stammt die Aminogruppe von proteingebundenen Lysinen (K-Substrat) bildet sich eine Isopeptidbrücke aus. <sup>[74]</sup> Dies führt auf Proteinebene zu inter- und intramolekularer Verknüpfung, was eine Steigerung der Proteinstabilität und hochmolekulare Aggregate zur Folge hat. In der Abwesenheit eines geeigneten Amins substrats wird die Hydrolyse der Carboxamidfunktion zu einer unreaktiven Carbonsäure katalysiert und damit das Q-Substrat deamidiert (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2 Katalysierte Reaktionen der mikrobiellen Transglutaminase aus *S. mobaraensis*.** A, Bildung des initialen Acyl-Enzym-Komplex zwischen Protein 1 (P1) und *Sm*-TG (mTG). B, Homo (P1/P1) bzw. Hetero-Dimerisierung (P1/P2) von Proteinen über Isopeptidbindungen. C, Glutaminhydrolyse in Abwesenheit eines primären Amins. D, Konjugation geeigneter Acyl-Akzeptoren mit Fluorophoren, Biotinderivaten und anderen Verbindungen.

Ungeachtet der Tatsache, dass pro- wie auch eukaryontische TGasen die gleiche Reaktion katalysieren, sind außer dem konservierten Aktivzentrum bestehend aus Cystein, Histidin und Aspartat strukturelle Gemeinsamkeiten kaum vorhanden. <sup>[74]</sup> Des Weiteren unterscheidet sich die Anordnung der cysteinprotease-ähnlichen, katalytischen Triade von humanen TGasen und *Sm*-TG. Die Reaktion entspricht bei Eukaryonten im Wesentlichen einer umgekehrten Proteolyse, die durch Cysteinproteasen mit einer ähnlichen katalytischen Triade durchgeführt wird, weshalb beide Enzymklassen auch in die gleiche Superfamilie eingeordnet werden. <sup>[75-77]</sup> Die katalytisch wichtigen Seitenketten His274 und Asp255 sind im Vergleich mit *Sm*-TG relativ zum zentralen Cys64 vertauscht. Es wird daher angenommen, dass das mikrobielle Enzym das Histidin nur als stabilisierenden und substratausrichtenden Rest nutzt und nicht direkt an der Katalyse beteiligt. Man spricht daher auch bei *Sm*-TG von einer katalytischen Diade. <sup>[74]</sup> Die Unterschiede im Aktivzentrum und in den Tertiärstrukturen zwischen *Sm*-TG und Faktor XIII-artigen tierischen TGasen legen eine konvergente molekulare Evolution dieser Enzyme nahe. Der hypothetische Mechanismus der mikrobiellen TGase nach Kashiwagi *et al.* sowie deren gelöste Tertiärstruktur sind nachfolgend in Abb. 2.3 A, B dargestellt. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stellt hierbei die initiale Bildung des Acyl-Enzymkomplexes zwischen TGase und dem Q-Substrat dar, worüber sich wahrscheinlich auch die Substratspezifität des Enzyms definiert.

Die Expression von *Sm*-TG erfolgt, wie bei den meisten sezernierten Proteinen grampositiver Bakterien, als Präproenzym. Die Funktion von Propeptiden ist hierbei sehr unterschiedlich und reicht von einer gesteigerten Sekretionsgeschwindigkeit, der Verankerung des Proteins in der Zellwand, dem Schutz vor

---

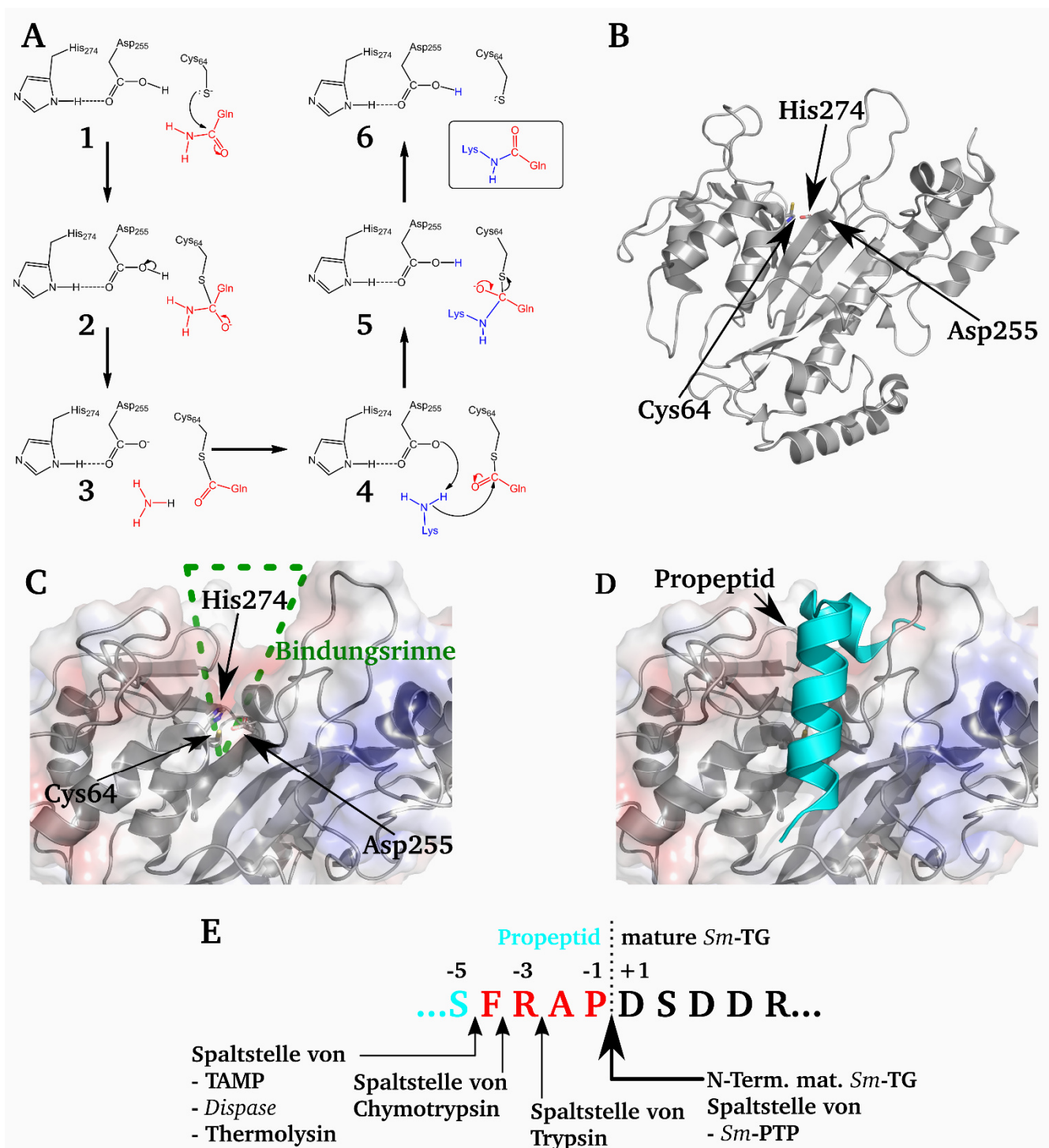
verfrühter Degradation durch endogene Proteasen, einer Faltungshilfe in Form eines intramolekularen Chaperons bis hin zur Aktivitätsregulation zum Schutz vor unkontrollierter Aktivität. [78-81]

Im Falle der mikrobiellen TGase kommen wahrscheinlich hauptsächlich die Funktionen der Regulation und Inhibierung des Enzyms zum Tragen. Das Propeptid liegt direkt über der Rinne des Aktivzentrums und verhindert damit im Vergleich zur reifen mTG effektiv den Eintritt von Substratproteinen (Abb. 2.3, C und D).

Die Prozessierung des inaktiven Zymogens erfolgt extrazellulär durch zwei endogene Proteasen von *S. mobaraensis*, die Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease TAMP (P83543) sowie eine bisher noch nicht näher charakterisierte Prolyl-Tri/Tetrapeptidyl-Aminopeptidase (*Sm*-PTP) innerhalb der konservierten SFRAP-Schleife. [82-84] Eine Besonderheit stellt hierbei die Tatsache dar, dass die Aktivierung nicht ausschließlich nur von endogenen, sondern auch von exogenen Proteasen realisiert werden kann, was hinsichtlich der Regulation des Enzyms eine bedeutende Rolle spielt. Im Aktivierungsbereich der *Sm*-TG zwischen Propeptid und reifen Enzym (SFRAP-Region) befinden sich neben den TAMP- und *Sm*-PTP-Schnittstellen auch welche für weitere Metallo- und Serinproteasen (Abb. 2.3 E).

Mikrobielle Transglutaminasen werden, im Grunde seit ihrer Entdeckung, kommerziell vor allem in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, da sie im Gegensatz zu ihren eukaryontischen Vertretern keine  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. Guanosintriphosphat (GTP)-Abhängigkeit besitzen und zudem relativ einfach in großen Mengen produziert und aufgearbeitet werden können. Heutzutage werden Transglutaminasen hauptsächlich in der Fleisch-, Fisch-, Molkerei- und Backindustrie eingesetzt. [85, 86] Bei der Wurst- und Formfleischherstellung nutzt man die Quervernetzung der Proteine zur Veränderung der mechanischen Eigenschaften oder erhöht die Stabilität der Produkte. Mit mTGs lassen sich darüber hinaus die Textur und Konsistenz von Joghurt, Eiskrem, Milch und Käse beeinflussen. Gleiches gilt ebenfalls für Weizenmehlprodukte wie zum Beispiel Nudeln und Brot. [87, 88] Neben der unspezifischen Quervernetzung von zumeist denaturierten Proteinen gewann in den letzten Jahren verstärkt die zielgerichtete enzymatische Konjugation einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichen Acyl-Akzeptoren oder synthetischen Q-Substraten an Bedeutung. [89] Aufgrund unterschiedlicher Selektivität und Katalyse steht *Sm*-TG dabei auch in Konkurrenz mit anderen Enzymklassen, wie bspw. Sortase A, SpyLigase und das Formyl-Glycin-generierende Enzym (FGE). [90-93] Die Konjugation beschränkt sich dabei nicht nur auf die Verknüpfung von Proteinen untereinander, sondern reicht von Protein-DNA-, über Protein-Polymer- bis hin zu Antikörper-Toxin-Konjugaten (ADC).

Die großen Vorteile, welche die enzymatische gegenüber der chemischen Konjugation besitzt, liegen zum einen in der Spezifität und Selektivität der Verknüpfung, zum anderen in den milden Bedingungen, die im Vergleich zum chemischen Ansatz angewendet werden können.



**Abb. 2.3 Katalyse, Struktur und Zymogen-Regulation der *Sm*-TG von *S. mobaraensis*.** A, hypothetischer Mechanismus der *Sm*-TG nach Kashiwagi *et al.* [74] His274, obwohl nicht direkt an der Katalyse beteiligt, ist aufgrund der orientierenden Funktion von Asp255 ebenfalls dargestellt. B, Tertiärstruktur von *Sm*-TG als Cartoon mit herausgestellten AS Cys64, Asp255 und His274 (PDB ID: 1IU4). C/D, Vergrößerung der Bindungsrinne des Enzyms nach (C) und vor (D) der Prozessierung (PDB ID: 3IU0). E, Aktivierungsbereich der *Sm*-TG mit Spaltstellen diverser Proteasen. Strukturabbildungen wurden mithilfe von PyMOL generiert. [94]

Durch die chemische Kopplung von aminierter DNA mit Cbz-Glutaminylglycin (ZQG) zu ZQG-DNA war es bspw. möglich, mittels mTG und alkalischer Phosphatase bzw. eGFP als Acyl-Akzeptoren stabile Konjugate für Hybridisierungsexperimente zu generieren. [95] Zur Verlängerung der Halbwertszeit im Zielorganismus, eines der größten Probleme pharmazeutisch aktiver Proteine, hat sich unter anderem die chemische Konjugation mit Polymeren wie Polyethylenglycol (PEG) bzw. peptidischer Analoga wie



---

PAS etabliert. <sup>[96-98]</sup> Eines der am besten beschriebenen Proteine, welches mittels mTG PEGyliert wurde, stellt hierbei das humane Wachstumshormon hGH dar. Bei diesem wurden zwei reaktive Glutaminreste identifiziert, Q40 und Q141, an denen vorzugsweise die mTG-vermittelte Konjugation stattfindet. <sup>[99]</sup> Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit weiteren nicht-physiologischen Substratproteinen, wie dem humanen Interleukin 2 (*hIL-2*) und dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GCSF), erzielt werden. <sup>[100, 101]</sup>

Um zwei Proteine für bspw. Immunassays zu verknüpfen, wurde als Alternative zur chemischen Konjugation von einigen Forschungsgruppen damit begonnen, mTG zu verwenden, wodurch es Bechtold *et al.* unter anderem möglich war, mehrere Peroxidasen an Protein G zu knüpfen. <sup>[102]</sup> Andererseits konnte ebenfalls gezeigt werden, dass meist nur eine geringe Anzahl zum Wasser orientierter Glutamine generell und besonders in der Protein-Protein-Verknüpfung als Q-Substrat fungieren können. <sup>[103]</sup> Dieser Umstand bedeutet zwar einerseits eine Einschränkung der zur Verknüpfung stehenden Proteine, eröffnet andererseits die Verwendung bekannter Q-Substrat-Sequenzen als Protein-*Tags*. Die Fusion von mTG-*Tags* mit Proteinen, welche keine natürlichen Substrate darstellen, eröffnet so eine umso spezifischere und kontrollierbarere Konjugation, wie anhand eines variablen Antikörper-Fragments gezeigt werden konnte. <sup>[104]</sup> Besonders im Zusammenhang mit Antikörper-Antigen-Interaktionen kann eine zielgerichtete Multimerisierung zudem zu gesteigerten Aviditäts-Effekten führen, welche die pharmakokinetischen Eigenschaften positiv beeinflussen. <sup>[105]</sup>

Eines der sich am schnellsten entwickelnden Einsatzfelder für die mTG-vermittelte Konjugation stellen die sog. Antikörper-Toxin-Konjugate (antibody drug conjugate, ADC) dar. Generell führt die Verknüpfung von Antikörpern mit zytotoxischen Wirkstoffen zu einer effektiveren Therapie mit weniger negativen Begleiterscheinungen als mit dem freien Agens. <sup>[106-108]</sup> Die bekanntesten Beispiele dafür stellen derzeit die beiden mit konventioneller chemischer Konjugation generierten, neben weiteren in der klinischen Phase befindlichen ADCs, *Kadcyla*<sup>®</sup> und *Adcetris*<sup>®</sup> dar, welche bei metastasierendem Brustkrebs bzw. Hodgkin-Lymphom eingesetzt werden. <sup>[109, 110]</sup> Nachteile ergeben sich, wie bereits erwähnt, dahingehend, dass durch diese Kopplungsverfahren heterogene ADC-Gemische entstehen, welche sich in der Position und Verteilung der kovalent gebundenen Wirksubstanzen stark unterscheiden und damit pharmakokinetische Parameter negativ beeinflussen. <sup>[111]</sup> Andere zielgerichtete chemische Ansätze mit höherer Selektivität bedürfen jedoch ebenfalls präparativer Maßnahmen wie bspw. die Einbringung reaktiver Cysteine bzw. unnatürlicher Aminosäuren. <sup>[112, 113]</sup>

Durch das große Potential zielgerichteter Toxinkonjugation in Bezug auf Stabilität, Produktion und verbesserte therapeutische Eigenschaften haben sich in den letzten Jahren jedoch enzymatische Verfahren, unter anderem mit mTG, verstärkt durchgesetzt. <sup>[114-116]</sup>

### 2.2.2. Substratspezifität

Obwohl bereits große Anstrengungen unternommen wurden, sich die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten von TGasen, speziell von mTG, zunutze zu machen, sind hinsichtlich der Substratspezifität des Enzyms weiterhin viele Fragen offen. In weitreichenden Untersuchungen konnte bisher die breite Akzeptanz von mTG hinsichtlich des Acyl-Akzeptors (primäres Amin) gezeigt werden, was eine grundlegende Voraussetzung für die Kopplung therapeutischer Substanzen ist. <sup>[117-119]</sup> Generell gilt, dass viele Glutamin- und Lysin-Seitenketten, als Substrat dienen können, so lange deren Zugänglichkeit gewährleistet ist. <sup>[120]</sup> Zunächst besitzen zwar die das Ziel-Glutamin umgebenden Aminosäuren einen starken Einfluss auf die Reaktivität, lassen jedoch daraus noch keine Bevorzugung für die Bindung von mTG ableiten. Zusätzlich scheint die lokale Umgebung auf Sekundär- und Tertiärstrukturebene den Zugang des Enzyms zu bestimmen. <sup>[97]</sup> Die Bedeutung der Primärsequenz wurde zunächst mit dem Heptapeptid GGGQGGG untersucht, bei dem individuell jedes Glycin durch eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde. <sup>[121]</sup> Dabei zeigte sich, dass hydrophobe Aminosäuren in den Positionen -3 bis -1 generell eine relativ zum Ausgangspeptid höhere Reaktivität aufweisen, diese jedoch bei allen untersuchten Varianten niedriger war als die des Modells substrats Z-Gln-Gly. Ausgehend davon konnten in weiteren Studien durch Einsatz von Hochdurchsatzscreeningverfahren (HTS) wie *Phage-Display* Peptidbibliotheken, welche 10<sup>11</sup> Dodecapeptid-Kandidaten enthielten, nähere Aussagen hinsichtlich der potentiell vorteilhaften Aminosäuren in der lokalen Umgebung getroffen werden. Diese bestätigten zum Teil die vorherigen Erkenntnisse und stellten zudem heraus, dass Peptide mit aromatischen Seitenketten (Trp, Phe, Tyr) in den Positionen -5 bis -3, ein Arginin bzw. hydrophobe Aminosäuren in den Positionen +1 oder +2 sowie hydrophobe Aminosäuren in den Positionen -2 und -1 erhöhte Reaktivität aufweisen. <sup>[122]</sup> Jedoch konnte auch in diesem Ansatz kein eindeutiges Sequenzmuster identifiziert werden, nach dem sich die Aktivität von mTG richtet. In einem weiteren HTS-Ansatz, unter Verwendung von mRNA-Display-Techniken, wurden zwei Pentapeptidsequenzen mit stark erhöhter Reaktivität und Affinität für mTG identifiziert (RLQQP und RTQPA), welche sich jedoch deutlich von den Ergebnissen des *Phage-Display* unterscheiden. <sup>[123]</sup> Obwohl die gewonnenen Erkenntnisse aus den beschriebenen HTS-Untersuchungen einen näheren Einblick in die Selektivität von mTG lieferten, muss beachtet werden, dass es sich dabei nur um die Analyse der Primärsequenzen von Peptiden handelt und eine effiziente Konjugation, wie bereits erwähnt, auch stark von der räumlichen Umgebung des Glutamins abhängig ist. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde versucht, durch nicht-physiologische Substratproteine, über die Primärsequenz hinausgehende Faktoren zu bestimmen, welche die Substratbindung beeinflussen. <sup>[98, 124]</sup> In einer dieser Studien wurden dafür der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (GCSF), humanes Interleukin-2 (hIL-2) sowie Myoglobin näher untersucht. Doch obwohl diese jeweils 17, 13 bzw. 6 Glutamine besitzen, wovon die meisten oberflächenständig sind, wurden jeweils nur ein bis zwei Glutamine als TG-Bindestelle akzeptiert, welche zudem in

unstrukturierten Bereichen lagen. Die Beobachtung, dass für die mTG-Reaktion ein hochflexibles Glutamin als Substrat präferiert wird, konnte in anderen Studien, die den Markierungsgrad in Abhängigkeit von der lokalen Entfaltung der Zielproteine untersuchten, bestätigt werden. <sup>[125]</sup> Eine Auswahl diverser Q-Substrat-Tags, welche aus bisherigen Untersuchungen hervorgegangen sind, ist in Tab. 2.1 dargestellt. Bei allen bisherigen Untersuchungen wurden jedoch intrinsische physiologische Substrate der mTG aus *S. mobaraensis* selbst meist außer Acht gelassen.

**Tab. 2.1 Auszug einiger in Anwendung befindlicher Acyl-Donor-Sequenzen für die mTG-vermittelte Konjugation**

Protein	Aminosäuresequenz	Ref.
<i>hIgG tag</i>	LLQG	[126]
<i>hIgG1 deglycosyliert</i>	PWEEQYNST	[127]
<i>Phage-Display Sequenztreffer</i>	Ac-WALQRPH-NH <sub>2</sub>	[122]
	WALQRPYTLTES	[122]
	WALQRPHYSYPD	[122]
	WSPIPQMRTVPP	[122]
	NPKIYPMQGWV	[122]
	YELQRPYHSELP	[122]
	VLNLAQSKNFH	[100]
<i>humanes Interleukin-2 (hIL-2)</i> <i>mRNA-Display-Sequenztreffer</i>	RTTRCTTLQQ	[123]
	ALQQVPDDSL	[123]
	SLQQPPWRGL	[123]
	KYKTQPHSAG	[123]
	DGQPGHENTR	[123]
<i>Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (GCSF)</i>	APALQPTQGAM	[101]
<i>humaner Wachstumsfaktor (hGH)</i>	IPKEQKYSF	[99]
<i>Myoglobin</i>	MGGSPLAQSHGGS	[104]
<i>S-tag</i>	KETAAAKFERQHMS	[103]

Diese liefern jedoch potentiell noch bessere Einblicke in die chemischen und strukturellen Voraussetzungen einer reaktiven Bindestelle, da sie sich in der Evolution selektiv zu geeigneten Q-Substraten entwickelt haben.

### 2.2.3. Intrinsische Substratproteine

Bei der Forschung in der Arbeitsgruppe Fuchsbauer, welche sich vornehmlich mit *Sm*-TG und seinen Substraten beschäftigt, konnten neben der Etablierung eines einfachen Verfahrens für die Produktion und Isolation des Vernetzungsenzyms auch weitere physiologische Substrate extrahiert und in Teilen charakterisiert werden. <sup>[62, 128-132]</sup> Bei diesen handelt es sich mit Ausnahme von einem Vertreter ausschließlich um inhibitorische Proteine mit unterschiedlichen Zielenzymfamilien.

Das erste isolierte und charakterisierte *Sm*-TG-Substrat in dieser Reihe stellt der *Streptomyces* Subtilisin- und TAMP-Inhibitor (SSTI, P83544) dar, welcher sechs Glutamine und acht Lysine besitzt. Hierbei handelt es sich um ein homodimeres Protein von 2x14 kDa mit einer hohen Thermostabilität, welches sich namensgebend als doppelköpfiger Inhibitor gegen die Serinprotease Subtilisin und die *Sm*-TG-prozessierende Metalloprotease TAMP richtet. <sup>[133]</sup> Durch seine Spezifität, Thermostabilität und hohe Sequenzhomologie wurde er in die Familie der *Streptomyces*-Subtilisin-



---

Inhibitoren (SSI, I16) eingeordnet und nicht in die Familie der strukturell verwandten *Streptomyces*-Metalloprotease-Inhibitoren (SMPI), welche sich gegen Mitglieder der Thermolysin-Familie richten. <sup>[61, 134-136]</sup> Durch seine inhibierende Wirkung gegenüber TAMP spielt SSTI des Weiteren eine große Rolle in der Aktivierung und Regulation von *Sm*-TG, was erstaunlich ist, da es sich ebenfalls um ein gutes Q- wie auch K-Substrat handelt. <sup>[82]</sup> Bemerkenswert ist jedoch, dass sich die Reaktivität von *Sm*-TG mit zunehmender Kultivierungsdauer stark verringert, was wahrscheinlich auf post-translationale Modifikation zurückzuführen ist (vgl. Abb. 2.2).

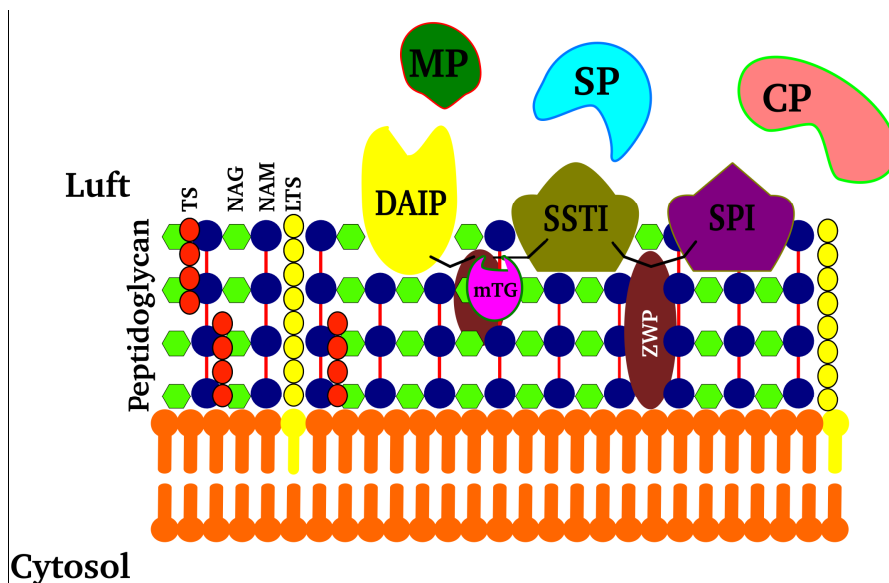
Mit dem 12 kDa großen *Streptomyces*-Papain-Inhibitor (SPI, P86242) gibt es einen weiteren Vertreter der intrinsischen Substratproteine, welcher sich jedoch, im Gegensatz zu SSTI, gegen Papain-artige Cysteinproteasen richtet. SPI besitzt sechs potentiell reaktive Lysine und drei Glutamine und zeichnet sich ebenfalls durch seine relativ hohe Thermostabilität aus. <sup>[131, 133, 137]</sup> Im Zuge weiterer Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von SPI wurde festgestellt, dass es sich dabei um zwei getrennte Moleküle handelt; einem proteinösen Teil, SPI<sub>p</sub>, und einem niedermolekularen, inhibitorisch aktiven Molekül, SPI<sub>ac</sub>. <sup>[138]</sup> Die Untersuchung beider Moleküle ist derzeit Thema einer anderen Dissertation, welche nach derzeitigem Stand die Zusammengehörigkeit beider in Frage stellt. <sup>[139]</sup> Im Vergleich mit SSTI stellt SPI<sub>p</sub> zudem ein schlechtes Q-Substrat dar, was sich hinsichtlich der Untersuchung der Substratspezifität von *Sm*-TG nutzbar machen lässt.

Erst kürzlich konnte mit *Sml*-1, einer Klasse C  $\beta$ -Lactamase, ein nicht-inhibierendes, jedoch zur Verteidigung einsetzbares, enzymatisch aktives Q- und K-Substrat isoliert und partiell charakterisiert werden. <sup>[132]</sup> Durch Homologie-Modelling war es möglich eine putative Tertiärstruktur zu bestimmen, welche einen Großteil der teils geclusterten Glutamine in der N-terminalen Helix des Enzyms anzeigte. *Sml*-1 ist damit ein exzellentes Beispiel für die Untersuchung der Substratspezifität in Bereichen mit helikalen Sekundärstrukturelementen.

Außerdem wurde mit dem Dispaseautolyse-induzierenden Protein (DAIP, P84098) ein weiteres Substrat von *Sm*-TG identifiziert und isoliert, welches seine inaktivierende Wirkung gegenüber Mitgliedern der M4-Proteasefamilie wie Dispase und Thermolysin entfaltet und sie dabei in die Autolyse zwingt.

Es liegt zudem nahe, dass *Sm*-TG im Zusammenspiel mit den physiologischen Substraten eine erweiterte Rolle, ähnlich der intrazellulären mTG aus *B. subtilis* beim Aufbau von Endosporen, einnimmt. Diese bilden wahrscheinlich quervernetzt mit Zellwandproteinen eine Schutzschicht gegen diverse exogene Proteasen (Abb. 2.4). <sup>[140]</sup> Die Annahme wird zudem durch die Beobachtung gestützt, dass die TAMP-verwandte SGMP-II (SgmA) und das SSTI-Analogon SgiA aus *S. griseus* erst durch den auch zur Lufthyphenbildung und Produktion von Sekundärmetaboliten benötigten A-Faktor gebildet werden, welcher den essentiellen Transkriptionsfaktor *AdpA* durch Freisetzung von *ArpA* reguliert. <sup>[141]</sup> Das hochkonservierte Protein *AdpA* ist auch bei *S. mobaraensis* vorhanden (persönliche Kommunikation: Prof. Dr. H.-L. Fuchsbauer, Hochschule Darmstadt).

Es gibt zudem Hinweise darauf, dass mTG bei Streptomyceten wie *S. mobaraensis* und *S. hygroscopicus* essentiell für die Entwicklung von Lufthyphen ist. Ein „nackter“ Phänotyp zeigte das vollständige Ausbleiben des Lufthyphenwachstums nach Deletion des entsprechenden mTG-Gens bei *S. hygroscopicus* an. [142, 143] Zusammenfassend scheint die Substratspezifität der Sm-TG über eine Kombination aus Primärsequenz, Sekundärstruktur als auch Flexibilität und Zugänglichkeit des umgebenden Bereichs definiert zu sein. Um ein besseres Verständnis für die Assoziation und den Katalysemechanismus zu erlangen, sollen daher unter anderem die Q-Substrateigenschaften von DAIP mit seinen insgesamt fünf Glutaminresten untersucht werden.



**Abb. 2.4 Putatives Modell des Einbaus inhibitorischer Proteine durch Sm-TG während der Lufthyphenbildung von *S. mobaraensis*.** Der Proteinfilm auf der Peptidoglycanschicht aus SPI, SSTI und DAIP richtet sich gegen Cysteinproteasen (CP), Subtilisin-ähnliche Serinproteasen (SP) sowie neutrale Metalloproteasen (MP). TS: Teichonsäure; LTS: Lipoteichonsäure; NAG: N-Acetylglucosamin; NAM: N-Acetylmuraminsäure; ZWP: Zellwandproteine wie Chapline und Rodline. In Anlehnung an Schmidt *et al.*, 2011. [131]

### 2.3. Das Dispaseautolyse-induzierende Protein DAIP

Bei dem 37 kDa großen Dispaseautolyse-induzierenden Protein DAIP handelt es sich um eines von bisher drei identifizierten Proteinen aus *S. mobaraensis* mit einer biologischen Wirkung gegen Proteasen. DAIP unterscheidet sich jedoch in weiten Teilen von den zuvor beschriebenen Inhibitoren SPI<sub>p</sub> und SSTI sowie den SMPis. Der empirisch bestimmte isoelektrische Punkt liegt mit 7.1 niedriger und DAIP besitzt nur eine mäßige Thermostabilität. [62] Der größte Unterschied wird jedoch in der Wirkungsweise offenbar, da es im Gegensatz zu den meisten Inhibitoren eine Protease nicht nur in ihrer Aktivität hemmt, sondern in die Autolyse zwingt und damit vollkommen zerstört. Daher ist es weniger als Inhibitor und vielmehr als inaktivierendes Protein anzusehen. Zudem scheint das Protein das Wachstum von Schimmelpilzen zu hemmen. [62]

Zu den bisher identifizierten Enzymen, welche von DAIP beeinflusst werden, zählt zunächst die namensgebende neutrale M4-Protease *Dispase* aus *Paenibacillus polymyxa*, bei der die besondere Art der Inhibition das erste Mal nachgewiesen werden konnte. Bereits bei einem I/E-Verhältnis von 0.1 tritt die

---

vollständige Inaktivierung des Enzyms innerhalb von 30 min ein. Dies ist einer der Gründe, warum DAIP ein enzymatischer Charakter zugeschrieben wird. Da es sich bei *Dispase* um einen Markennamen handelt und um Verwirrungen zu vermeiden, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch die gebräuchliche Bezeichnung des *npr*-Genprodukts (P29148), Bacillolysin, verwendet. Die M4-Metalloprotease Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* rokko bzw. *Geobacillus stearothermophilus* stellt das zweite bisher identifizierte Ziel von DAIP dar, auch wenn die benötigte Konzentration für die Autolyseinduktion deutlich höher liegt. Das wiederum ist möglicherweise auf die generell höhere Stabilität des Enzyms zurückzuführen. Obwohl DAIP gegenüber proteolytischer Hydrolyse durch andere Proteasen relativ inert ist, fragmentiert Thermolysin nach dem Kenntnisstand vor dieser Arbeit das inaktivierende Protein.<sup>[62]</sup> DAIP hat gegenüber Serin- und Cysteinproteasen keine Wirkung; ebenso wenig gegenüber anderen Metalloproteasen, wie bspw. der M9-Protease Collagenase aus *Clostridium histolyticum*. DAIP besitzt demnach eine Spezifität für Mitglieder der M4-Metalloproteasefamilie. Eine Ausnahme von dieser Regel stellt hingegen die Transglutaminase-prozessierende TAMP von *S. mobaraensis* dar, welche durch das inaktivierende Protein nicht beeinflusst wird, obwohl sie zur M4-Familie gehört.

Vorangegangene Untersuchungen konnten weiterhin zeigen, dass die Anwesenheit von Calcium- bzw. Zink-Ionen kaum die Wirkung von DAIP beeinflussen.<sup>[62]</sup>

Aufgrund der hohen Inaktivierungsgeschwindigkeit des Zielenzyms wurde zudem untersucht, ob DAIP selbst eine proteolytische Aktivität besitzt und damit den Abbau der Zielprotease katalysiert. Unspezifische Substrate wie Casein, Hämoglobin, Myoglobin und Myosin ebenso wie aus der Bacillolysinsequenz-abgeleitete interne und terminale Peptide gingen jedoch unverändert aus der Reaktion hervor, sodass keine hydrolytische Aktivität von DAIP auszugehen scheint.<sup>[62, 138]</sup> Derzeit wird daher ein Mechanismus angenommen, bei dem die Zielprotease durch Interaktion mit dem inaktivierenden Protein in ihrer Konformation so verändert wird, dass sensible Peptidsequenzen freigelegt werden. Die Hydrolyse dieser Bindungen stellt dann nach dieser Vorstellung den Beginn der Autolyse dar.

Die Primärsequenz von DAIP war bis in das Jahr 2013 fast gänzlich unbekannt, sodass zur Einordnung und Identifikation unter anderem der N-Terminus über Edman-Abbau bestimmt wurde. Dies änderte sich jedoch als das Genom von *S. mobaraensis* im Jahr 2013 vollständig sequenziert wurde.<sup>[144]</sup> Ein damaliger Sequenzvergleich führte zu dem Ergebnis, dass DAIP keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen aufweist und daher als neuartiges Protein anzusehen war.<sup>[138]</sup> Durch die rapide Zunahme sequenzierter Genomsequenzen, vor allem von Actinomyceten, konnten in den letzten Jahren nun doch, zumindest auf DNA-Ebene, verwandte Proteine identifiziert werden, welche meist bei anderen Streptomyceten anzutreffen sind. Erste Mutagenese-Studien mit DAIP zur Ermittlung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren scheiterten jedoch, da die generierten Varianten entweder unveränderte oder doppelt so hohe Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zeigten.<sup>[145]</sup>

---

Des Weiteren war es durch die Sequenzierung möglich, auch die Anzahl der Lysin- und Glutaminseitenketten zu bestimmen, welche potentiell für die Reaktion mit *Sm*-TG zur Verfügung stehen, was eine Grundvoraussetzung für die nähere Charakterisierung der Transglutaminasebindestellen darstellt. Da sich die Substratspezifität der *Sm*-TG jedoch nicht nur über die Primärsequenz, sondern vor allem durch strukturelle Eigenschaften der direkten Umgebung definiert, ist es im Weiteren nötig, auch die Tertiärstruktur von DAIP aufzuklären. Dies ist besonders auch im Hinblick auf den Mechanismus wichtig, um die Aminosäuren, die an der Interaktion mit Metalloproteasen beteiligt sind, zu identifizieren.

## 2.4. M4-Metalloproteasen

### 2.4.1. Verbreitung/Vorkommen

Metalloproteasen sind die Zielproteine von DAIP. Sie hydrolysieren, im Gegensatz zu Serin/Threonin-, Cystein- oder Aspartyl/Glutamylproteasen, eine Peptidbindung durch Aktivierung eines Wassermoleküls über ein katalytisches zweiwertiges Metallion. Alle Mitglieder der Thermolysin-Familie M4, welche bei Bakterien, Archaeen, Pilzen und anderen Mikroorganismen anzutreffen sind, nutzen dafür ein  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion und lassen sich anhand diverser Merkmale eindeutig zuordnen. Ihnen ist zunächst ein hoch konserviertes HEXXH-Motiv gemein, indem die Histidine als Zink-Liganden und das Glutamat als Teil des Aktivzentrums fungieren. Das Metallion wird dabei bei den dem MA(E)-Clan zugeordneten „Glu-Zincins“ durch ein weiteres Glutamat komplexiert, das sich 20-33 Aminosäuren weiter aufwärts im konservierten Motiv Glu-(Xaa)<sub>3</sub>-Asp befindet. <sup>[58, 146, 147]</sup> Trotz der signifikanten Ähnlichkeiten hinsichtlich Aktivität und Spezifität wurden bislang noch weitere Merkmale innerhalb des MA-Clans identifiziert, die die vorhandenen Unterschiede dieser Enzyme herausstellen. Die Unterteilung der M4-Proteasen erfolgt in drei Gruppen, (i) Thermolysine aus *Bacillus thermoproteolyticus* (P00800), *Geobacillus stearothermophilus* (P43133) und anderen, (ii) Thermolysin-ähnliche Proteasen (TLP) aus weiteren *Bacillus*-Bakterien wie *B. cereus* sowie verwandten Firmicutes und (iii) Bacillolysine wie die neutrale Protease *Dispase* aus *Paenibacillus polymyxa* (P29148).

Thermolysin und andere M4-Proteasen finden heutzutage vor allem Anwendung bei der Peptid- und Estersynthese. Ein Produkt ist bspw. der künstliche Süßstoff Aspartam, ein Dipeptid aus Asparaginsäure und Phenylalanin. <sup>[148-150]</sup> Im biotechnologischen Bereich wird die relativ unspezifische Protease wiederum häufig zur Generierung geeigneter Fragmente bei der Peptid-Sequenzierung eingesetzt. Durch die mechanistischen Ähnlichkeiten mit Angiotensin converting enzyme (ACE) und Carboxypeptidase A, etablierte sich Thermolysin zudem als ein Schlüsselenzym in der Entwicklung blutdrucksenkender Wirkstoffe. <sup>[151]</sup> Die M4-Familie schließt neben Thermolysin eine hohe Anzahl weiterer extremophiler Proteasen (Thermostzyme) aus thermophilen Organismen ein, welche sich durch ihre außerordentliche Widerstandsfähigkeit gegenüber Lösungsmitteln, pH und Temperatur auszeichnen und damit großes

---

Potential für den industriellen Einsatz besitzen. <sup>[152, 153]</sup> Vibriolysin aus *Vibrio proteolyticus* findet zudem auch in medizinischen Bereichen Anwendung bei der Entfernung geschädigter Hautpartien von Verbrennungsoptionen und deren Heilung. <sup>[154, 155]</sup> Die neutrale Metalloprotease Bacillolysin von *P. polymyxa*, welche unter dem Namen *Dispase* vertrieben wird und das erste identifizierte Zielprotein von DAIP darstellt, findet vornehmlich Anwendung in der Zellbiologie bei der Auflösung von Zellverbänden. <sup>[156, 157]</sup>

Bei den meisten Proteasen der M4-Familie handelt es sich um sekretierte Enzyme, welche extrazelluläre Proteine und Peptide zur bakteriellen Nährstoffversorgung hydrolysieren. So exprimieren *Bacilli* ihre Metalloproteasen hauptsächlich in der späten exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase vor der Sporulation, wenn essentielle Nährstoffe limitierend werden. <sup>[158]</sup>

Darüber hinaus gelten jedoch einige Vertreter auch als Pathogenitätsfaktoren bei einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten. Die TLP  $\lambda$ -Toxin von *Clostridium perfringens* bspw. hydrolysiert zahlreiche Proteine wie Immunglobulin G (IgG) und  $\alpha_2$ -Makrotubulin, welche an den angeborenen und adaptiven Immunreaktionen beteiligt sind und aktiviert weitere zur Infektion benötigte Vorläuferproteine. <sup>[159]</sup> Auch *Staphylococcus aureus* sekretiert mit Aureolysin (P81177) eine neutrale M4-Protease, welche in ähnlicher Weise invasiv wirkt und zudem das adaptive Immunsystem durch Inhibition der IgG-Produktion lahmlegt. <sup>[160]</sup> Hemagglutinin/Proteinase von *Helicobacter pylori* und *Vibrio cholerae* wird ebenfalls im Zusammenhang mit der Pathogenität der Bakterien und der damit einhergehenden Auslösung von Gastritis, Magengeschwüren und Magenkrebs als ursächlich betrachtet. <sup>[161, 162]</sup> Die Elastase LasB (P14756) von *Pseudomonas aeruginosa*, auch als Pseudolysin bekannt, wirkt dabei in mehrerlei Hinsicht invasiv. Zum einen wird durch die elastinolytische Aktivität des Enzyms das Gewebe des Wirts nachhaltig durch Elastin- und Collagenabbau geschädigt. Dies drückt sich durch eine starke hämorrhagische Wirkung und Muskelabbau aus, welcher zu einer Lungenentzündung führen kann. <sup>[163-165]</sup> Zum anderen wirkt Pseudolysin, ähnlich wie  $\lambda$ -Toxin und Aureolysin, direkt auf das Immunsystem des Wirts durch Abbau von IgG-Molekülen und Proteinen des *Complement*-Systems sowie durch Beeinflussung endogener Proteasen, welche essentiell für verschiedene Zellfunktionen sind. <sup>[166-168]</sup>

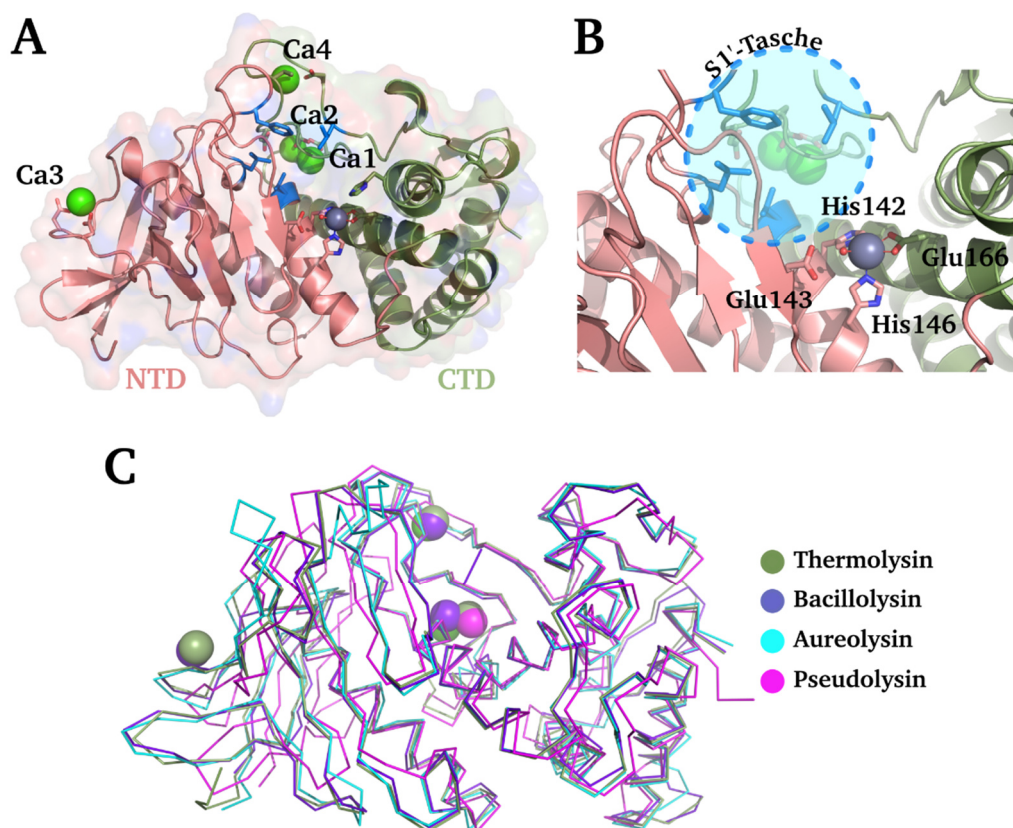
Die Pathogene *S. aureus* und *P. aeruginosa* zählen heute deshalb als Verursacher von Sepsis auch zu den problematischen Krankenhauskeimen und sind daher potentielle Zielerreger für neue Hygienestrategien und therapeutische Behandlung. <sup>[169]</sup>

#### **2.4.2. Struktur und Katalysemechanismus**

Trotz der Vielzahl an M4-Proteasen sind bisher erst von einem Bruchteil die Tertiärstrukturen ermittelt worden. Bei diesen handelt es sich unter anderem um Thermolysine von *B. thermoproteolyticus* (PDB ID: 1TLN) und *B. cereus* (PDB ID: 1NPC), Pseudolysin von *P. aeruginosa* (PDB ID: 1EZM),



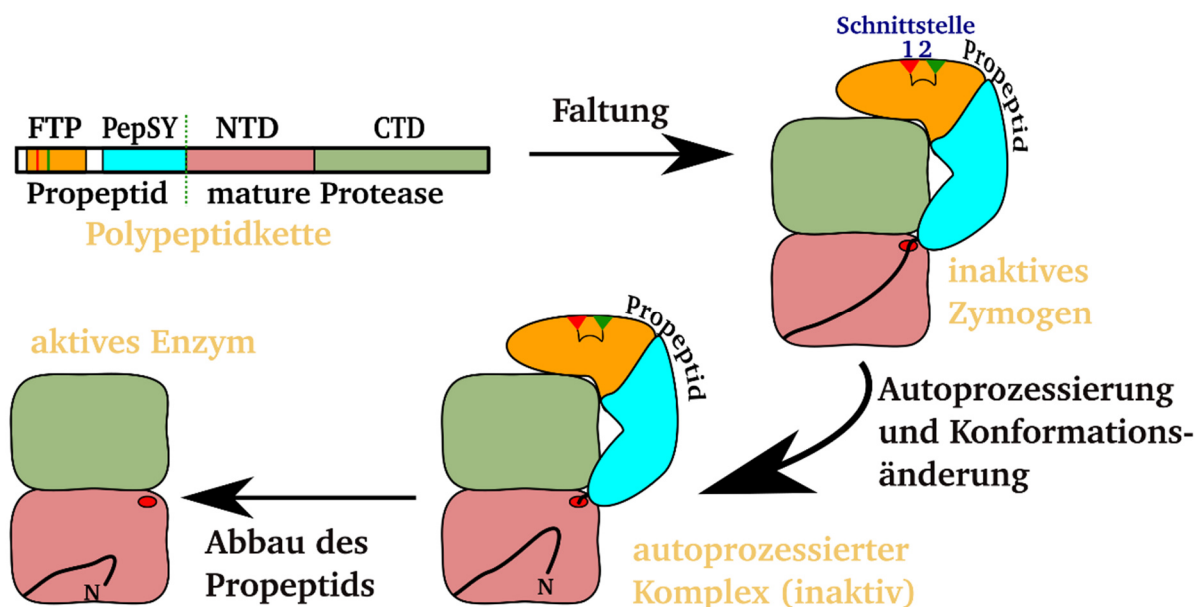
Aureolysin von *S. aureus* (PDB ID: 1BQB) und Bacillolysin/Gentlyase (PDB ID: 4GER) von *P. polymyxa*, wobei die Erstgenannte auch die erste jemals aufgeklärte Struktur einer Metalloendoprotease darstellt. [170] Thermolysin hat zur Stabilisierung und zum Schutz vor Autolyse vier Calcium-Ionen gebunden, welche teilweise, jedoch nicht ausschließlich, ein Grund für die hohe Thermostabilität dieser Enzyme sind. [171, 172] Die Nomenklatur der Calcium-Bindestellen anderer Metalloproteasen folgt seither auch der von Thermolysin, wobei nicht alle Vertreter, wie bspw. Bacillolysin, vier Calcium-Ionen gebunden haben. Die Tertiärstruktur der genannten Proteasen ist, trotz variabler Sequenzidentitäten, vergleichsweise hoch konserviert, weshalb deren Eigenschaften anhand des Aufbaus von Thermolysin näher beschrieben werden soll (Abb. 2.5). Die Enzyme bestehen zunächst aus zwei Domänen zwischen denen sich das Aktivzentrum befindet. Die N-terminale Domäne (NTD), welche auch das HEXXH-Motiv und das für die Stabilität essentielle Ca(3) enthält, setzt sich aus  $\alpha$ -Helices und mehreren  $\beta$ -Faltblättern zusammen. [173] Die C-terminale Domäne (CTD) besteht hingegen hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices und trägt den für „Glu-Zincins“ typischen, dritten Komplexpartner des katalytischen Zink-Ions Glutamat.



**Abb. 2.5 Struktur der neutralen Metalloprotease Thermolysin aus *B. thermoproteolyticus*.** A, zwei-Domänen-Struktur der M4-Metalloprotease bestehend aus N-terminaler (NTD, lachsfarbig) und C-terminaler Domäne (CTD, grün) (PDB ID: 1TLX). Die stabilisierenden bzw. an der Katalyse beteiligten Calcium- und Zink-Ionen sind jeweils in hellgrün und lila dargestellt. B, Ausschnitt des Aktivzentrums mit herausgestellten katalytischen (His-142, Glu143, His146 und Glu166) und substratbindenden Aminosäuren (S1'-Tasche: Phe130, Leu133, Val139 und Leu202). C, Überlagerung der M4-Proteasen Thermolysin aus *B. thermoproteolyticus*, Bacillolysin aus *P. polymyxa*, Aureolysin aus *S. aureus* und Pseudolysin aus *S. aureus* (PDB IDs: 1TLX, 4GER, 1BQB, 1EZM). Strukturabbildungen wurden mit PyMOL generiert. [94]

Die meisten Thermolysin-ähnlichen M4-Metalloproteasen werden zunächst als Präproenzyme synthetisiert und danach sekretiert. Dabei dirigiert das Signalpeptid das Protein zur Plasmamembran

und induziert die Translokation in den extrazellulären Raum. Das Propeptid besitzt bei Mitgliedern dieser Familie eine besondere Funktion, da es meist mit inhibitorischer Wirkung die vorzeitige Aktivierung des Enzyms unterdrückt und vor allem als intramolekulares Chaperon fungiert, wodurch es die korrekte Faltung der maturen Protease unterstützt. <sup>[174, 175]</sup> Das Propeptid besteht dabei aus einer Fungalsin-Thermolysin-Propeptid-Domäne (FTP) und der sog. PepSY-Domäne, welche an ihrer Grenzfläche einen hydrophoben Kern bilden. Am Ende des Faltungsprozesses bindet das Propeptid, welches noch Teil der Polypeptidkette ist, in spezifischer Weise als Inhibitor mit der FTP-Domäne an die CTD und mit der PepSY-Domäne an die NTD. Durch Strukturänderungen legt sich anschließend die Schnittstelle zwischen Propeptid und dem maturen Enzym in das Aktivzentrum. Über einen autokatalytischen Aktivierungsmechanismus wird danach zunächst diese Peptidbindung gespalten, woraufhin es zu einer zweiten Konformationsänderung kommt, welche das Aktivzentrum frei gibt.

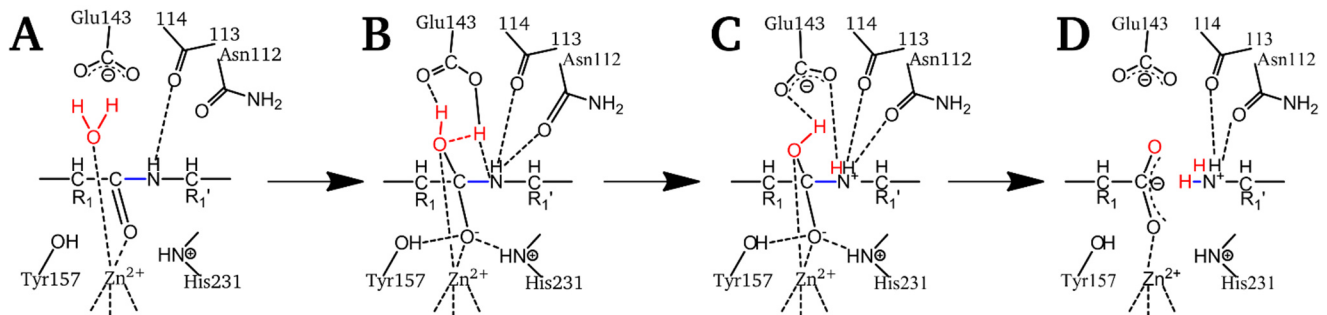


**Abb. 2.6 Schematische Darstellung der autokatalytischen Aktivierung Thermolysin-ähnlicher Metalloproteasen.** Nach der Faltung bindet das Propeptid direkt über die FTP- und die PepSY-Domäne an die katalytische Domäne. Der noch mit den Domänen des reifen Enzyms verbundene C-Terminus des Propeptids legt sich dabei in das Aktivzentrum und wird, nach Hydrolyse der Peptidkette, zu einem Inhibitor des maturen Enzyms. Durch einen energiegetriebenen Prozess nimmt der N-Terminus dabei seine finale Konformation ein, worauf das Propeptid, nach den initialen Schnitten an den Stellen 1 und 2 in der FTP-Domäne, abgebaut und das aktive Enzym freigegeben wird. <sup>[176]</sup>

Anschließend erfolgt nach zwei initialen konservierten Schnitten in der FTP-Domäne die Degradation des Propeptids und die Freisetzung des aktiven Enzyms (Abb. 2.6). <sup>[176]</sup>

Der Katalysemechanismus von Thermolysin und seinen Homologen ist bis heute Gegenstand von Kontroversen, besonders im Hinblick auf die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren und deren Funktion. Es wurden zwei unterschiedliche Mechanismen postuliert, um den Vorgängen bei der Katalyse Rechnung zu tragen. Bei dem ersten Vorschlag nimmt Glu143 (Thermolysin-Nummerierung) die Aufgabe einer allgemeinen Base/Säure ein, indem es das zur Hydrolyse notwendige zinkkoordinierte Wassermolekül aktiviert (Abb. 2.7). Der zweite postulierte Mechanismus hingegen schreibt Glu143 lediglich eine substratorientierende Funktion zu und weist His231 als die allgemeine Base aus. <sup>[177]</sup>

Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass His231 zwar den Übergangszustand stabilisiert, aber aufgrund des Abstandes nicht als Base fungieren kann. Zudem führt ein Austausch von Glu143 zu Alanin zur vollständigen Inaktivität des Enzyms.<sup>[174, 178-180]</sup> Weitere an der Katalyse beteiligte Aminosäuren sind Tyr157, Asp170 und Asp226. Thermolysin wie auch andere M4-Metalloproteasen besitzen hinsichtlich ihrer Substratspezifität eine hohe Präferenz für hydrophobe und voluminöse Seitenketten in P1'-Position (Leu>Phe>Ile>Val).



**Abb. 2.7 Postulierter Katalysemechanismus von M4-Metalloproteasen am Beispiel von Thermolysin.** Das Glutamat des HEXXH-Motivs (Glu143) fungiert hier als allgemeine Base/Säure. A, das eintretende Substrat verdrängt das zinkgebundene Wasser in Richtung Glu143. B, dabei erhöht sich die Nukleophilie des Wassers, welches, unter Ausbildung eines tetrahedralen Übergangszustands, den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung angreift. C, ein Proton des Wassers geht anschließend auf den Abgangsstickstoff über. D, durch einen zweiten Protonentransfer wird letztlich das Produkt gebildet und freigegeben. Angelehnt an Matthews *et al.*, 1988.<sup>[181]</sup>

Die Pseudolysin-Spezifität ist zwar relativ ähnlich, weist jedoch eine höhere Präferenz für voluminöse als für andere hydrophobe Seitenketten auf. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die Zusammensetzung und räumliche Position der Aminosäuren der S1'-Bindetasche (Phe130, Leu133, Val139 und Leu202) zurückzuführen.<sup>[182]</sup> Die Interaktionen mit den S1-, S2- und S2'-Bindetaschen sind im Weiteren nicht so stark ausgeprägt, wodurch sie nur einen zweitrangigen Einfluss auf die Substratspezifität haben.

### 2.4.3. Inhibition von M4-Metalloproteasen

Enzyme der M4-Familie stellen heute immer mehr potentielle therapeutische Ziele dar, was auf die gesteigerte Antibiotikaresistenz diverser Pathogene zurückzuführen ist. Diese Tatsache macht es notwendig, alternative Wege zu finden, um die Invasivität dieser Bakterien zu unterdrücken. Als unspezifische Inhibitoren für Metalloproteasen gelten im Allgemeinen Chelatbildner, wie bspw. EDTA und 1,10-Phenanthrolin, wobei nur die Inhibition mit der zweiten Verbindung reversibel ist. Da EDTA vorzugsweise Calcium-Ionen komplexiert, führt dies durch Entzug der stabilisierenden Metallionen, beginnend an definierten Schnittstellen, zur Autolyse des Enzyms.<sup>[183]</sup> Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich M4-Metalloproteasen durch höhere Zink-Konzentrationen inhibieren lassen. Ein zweites Zink-Ion, das im Aktivzentrum gebunden wird, verhindert dabei den Eintritt des Substrats.<sup>[184, 185]</sup> Spezifische Inhibitoren für die Thermolysin-Familie haben hingegen oft eine modifizierte Di- oder Tripeptidstruktur, die sich aus einer hydrophoben Aminosäure in P1'-Position und einer zinkbindenden Gruppe wie Phosphoramidat, Hydroxamat oder Carboxylat zusammensetzt. Durch Aufklärung der Tertiärstruktur in



---

Komplex mit einer Reihe kompetitiver und irreversibler Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass ein Großteil dieser Moleküle dabei das zinkkoordinierte Wassermolekül verdrängt und so ein tetrahedrales Übergangszustandsanalogon bildet. <sup>[186]</sup> Zu den bekanntesten natürlich vorkommenden Inhibitoren zählen dabei Phosphoramidon aus *Streptomyces tanashiensis*, die Klasse der proteinösen SMPs aus *Streptomyces* sp. sowie die induzierbaren Metalloprotease-Inhibitoren (IMPI) aus *Galleria mellonella*. <sup>[61, 187, 188]</sup> Alle diese Moleküle haben gemein, dass sie spezifisch das Aktivzentrum der Protease besetzen und somit die Bindung des Substrats bzw. dessen Hydrolyse verhindern. Die beobachtete Wirkungsweise von DAIP unterscheidet sich jedoch sehr stark von allen bisher bekannten inhibitorischen Proteinen, weshalb die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus ein Hauptziel dieser Arbeit darstellt.

---

## 2.5. Zielsetzung

Die enzymvermittelte zielgerichtete Konjugation von Proteinen mit funktionalen Molekülen nimmt in den vergangenen Jahren eine immer bedeutendere Rolle ein. Hierbei hat sich das Vernetzungsenzym *Sm*-TG aus *S. mobaraensis* bereits in vielen Anwendungen bewährt, wenn auch die Substratinteraktion und -spezifität bisher noch nicht zuverlässig bestimmt ist. Um in dieser Hinsicht einen Beitrag zu leisten, sollte zunächst die Tertiärstruktur des bereits identifizierten Transglutaminase-Substrats DAIP über Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Damit sollte es möglich sein, durch Austausch der reaktiven Glutamine und kinetischer Charakterisierung der Varianten die Selektivität des Vernetzungsenzyms für bestimmte Glutaminreste zu bestimmen. Gegenüber früheren Studien beruhte dieser Ansatz auf der Vermutung, dass sich die physiologischen Substrate evolutiv am besten der Struktur von *Sm*-TG angepasst haben. Der derzeitige Stand der Forschung, welcher sich größtenteils nur auf den Einfluss der Aminosäuren in Nachbarschaft eines peptidischen Glutamins stützt, sollte so um die daraus gewonnenen Erkenntnisse interner Bindestellen erweitert werden.

Weiterhin blieben alle bislang durchgeführten Untersuchungen zur Aufklärung des inaktivierenden Mechanismus von DAIP ohne Erfolg. Wie beschrieben induziert das Protein in einer katalytischen Weise die Autolyse seiner Zielproteasen, wodurch neutrale Proteasen wie Bacillolysin in einem molaren I/E-Verhältnis von 0.1 innerhalb von 30 min zerstört werden. Die Inaktivierung wird nach derzeitigen Erkenntnissen durch die Anwesenheit von zweiwertigen Calcium- und Zink-Ionen nicht signifikant beeinflusst. Vielmehr wird eine durch DAIP induzierte Konformationsänderung der Protease mit nachfolgender Hydrolyse der freigelegten Peptidbindungen angenommen.

Um das größte Hindernis bei der Untersuchung der Interaktion zwischen DAIP und Bacillolysin, die rasche Autolyse selbst, zu überwinden, sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst Verfahren für die rekombinante Produktion der neutralen Protease und einer nicht-funktionellen Variante durch Austausch des katalytischen Glutamats in Position 138 gegen Alanin etabliert werden. Die Interaktion von DAIP mit beiden Proteinen sollte dabei thermodynamisch und kinetisch untersucht werden. Eine geeignete Methode dafür ist die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Zur Beschreibung des mechanistischen Ablaufs waren jedoch weitere Analyseverfahren notwendig, die im Zuge der Arbeit erst entwickelt und etabliert werden mussten oder, aufgrund der selbstzerstörerischen Natur eines Beteiligten, zu Beginn noch nicht vorstellbar waren. Nach Isolation eines stabilen Komplexes zwischen den Partnermolekülen, war beispielsweise die Ko-Kristallisation ein naheliegender Versuch. Dadurch sollten letztlich die an der Bindung und Reaktion beteiligten Aminosäuren identifiziert sowie die These der induzierten Strukturänderung bestätigt werden. Eine solche Struktur des Komplexes sollte es dann schlussendlich erlauben eine genaue Beschreibung des zugrundeliegenden Mechanismus des DAIP zu geben.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Chemikalien

Standard-Chemikalien, wie Puffersubstanzen, Salze und Säuren/Basen, wurden über die Händler AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

#### spezielle Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
1,10-Phenanthrolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
3-(2-Furylacryloyl)glycylphenylalanylamid ( <i>FaGFa</i> )	Bachem AG, Bubendorf
Aceton	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Acrylamid, 4K-Lösung (30%), Mix 29:1	AppliChem, Darmstadt
Agar-Agar	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat, APS	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Benzamidin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bicinchoninsäure, Dinatriumsalz	Thermo Scientific, Dreieich
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumacetat-Monohydrat	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Calciumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Cbz-Glutaminylglycin	Zedira, Darmstadt
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma Aldrich, Steinheim
D(+)-Glucose-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
Dabcyl-Ser-Phe-EDANS ( <i>DabSFans</i> )	<i>Diese Arbeit</i> , Darmstadt
Dabcyl-succinimidylester	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Ethanol, absolut	VWR, Darmstadt
Ethanolamin, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma Aldrich, Steinheim
Guanidinium-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Hydroxylammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Imidazol	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Lactose	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Midori Green Advance	Nippon Genetics, Dören
N-(3-Dimethylamino)-propylauramid	Sigma Aldrich, Steinheim

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
N-Chloroacetyl-D-Phenylalanin	TCI, Eschborn
N-Biotinylcadaverin	Zedira, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Odyssey-Blocking-Reagenz	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Phytinsäure	TCI, Eschborn
SYPRO®-Orange Protein Gel Stain	Sigma Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Triethylenetetramin (TETA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Calbiochem, Darmstadt

### 3.1.2. Kits

Name	Hersteller/Vertrieb
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	VWR, Darmstadt
FastGene Gel/PCR Extraction Kit	Nippon Genetics, Dören
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Die Verwendung der aufgelisteten Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

### 3.1.3. Mikroorganismen

Stamm	Hersteller/Vertrieb
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> DH5α	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
<i>E. coli</i> BL21-(DE3)	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> BL21-(DE3) pLysS	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA
<i>S. mobaraensis</i> (DSM: 40487)	DSMZ, Braunschweig
<i>Paenibacillus polymyxa</i> (DSM: 36)	DSMZ, Braunschweig

### 3.1.4. Antikörper

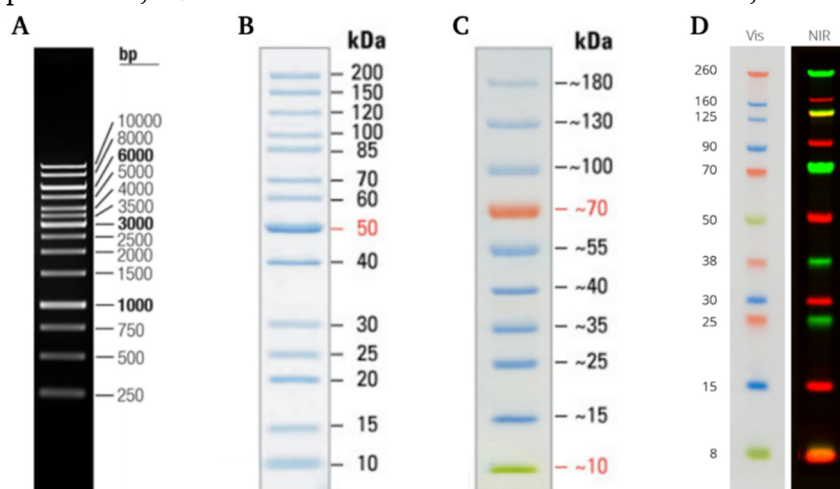
Stamm	Hersteller/Vertrieb
Cetuximab®-GEN	Arbeitskreis Kolmar, TU Darmstadt
IRDye® 680LT Goat anti-Rabbit IgG	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye® 800CW Streptavidin	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Rabbit anti-DAIP polyclonal IgG	Eurogentec, Seraing (B)
Rabbit anti-Sm-TG polyclonal IgG	Eurogentec, Seraing (B)
Rabbit anti-neutral protease polyclonal IgG	Acris Antibodies, Herford
Rabbit anti-His polyclonal IgG	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

### 3.1.5. Enzyme, Proteine und Molekulargewichtsstandards

Protein/Enzym	Hersteller/Vertrieb
Azocasein	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Glucosidase aus Mandel	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Casein (alkalilöslich)	Merck, Darmstadt

Protein/Enzym	Hersteller/Vertrieb
Chymotrypsin (bovin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Collagenase ( <i>C. histolyticum</i> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dispase (Bacillolysin aus <i>P. polymyxa</i> )	Worthington, Lakewood, NJ (USA)
<i>DNaseI</i>	AppliChem, Darmstadt
$\beta$ -Glucosidase (aus Mandeln)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TAQ DNA-Polymerase	AG Fuchsbauer, Hochschule Darmstadt
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Papain (aus Papaya)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
Pseudolysin (Elastase aus <i>P. aeruginosa</i> )	J. Köhnke, HIPS, Saarbrücken
rAureolysin	<i>Diese Arbeit</i> , Darmstadt
rBacillolysin	<i>Diese Arbeit</i> , Darmstadt
Restriktionsendonukleasen ( <i>Bam</i> HI-HF, <i>Dpn</i> I, <i>Nco</i> I-HF, <i>Nde</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I)	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
rPseudolysin	<i>Diese Arbeit</i> , Darmstadt
rThermolysin	<i>Diese Arbeit</i> , Darmstadt
<i>Streptomyces</i> -Subtilisin-und-TAMP-Inhibitor, SSTI	N. Jüttner, AG Fuchsbauer, Hochschule Darmstadt
Subtilisin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TAMP (Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease) aus <i>S. mobaraensis</i>	N. Jüttner, AG Fuchsbauer, Hochschule Darmstadt
Thermolysin aus <i>B. thermoproteolyticus</i> rokko	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thermolysin aus <i>G. stearothermophilus</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (Agarose-immob., ~2 mg Trypsin pro ml Gel)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Marker	Hersteller/Vertrieb
GeneRuler 1 kb DNA Ladder, #SM0314	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PageRuler unstained Protein Ladder, #26614	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PageRuler prestained Protein Ladder, #26616	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Chameleon Duo, prestained, #928-60000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg



**Abb. 3.1** Molekulargewichtsmarkermischungen für Agarose- und SDS-PA-Gelelektrophorese. A, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); B, PageRuler unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); C, PageRuler prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); D, Chameleon Duo, prestained (LI-COR Biosciences)

### 3.1.6. Gene und Vektoren

ID	Vektor	Plasmid	Gen <sup>a</sup>	Modifikation
<b>DAIP</b>	pUC57	pUC57-DAIP_opt	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	-
<b>pDF1</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	-
<b>pDF2</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-Q39-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q65/144/298/345N
<b>pDF2.1</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-GT36/37EE-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q65/144/298/345N, GT36/37EE
<b>pDF2.2</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-TL37/38YF-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q65/144/298/345N, TL37/38YF
<b>pDF3</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-Q65-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q39/144/298/345N
<b>pDF4</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-Q144-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q39/65/298/345N
<b>pDF5</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-Q298-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q39/65/144/345N
<b>pDF6</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-Q345-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q39/65/144/298N
<b>pDF7</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-Q <sub>0</sub> -CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Q39/65/144/298/345N
<b>pDF8</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-E99A-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	E99A
<b>pDF9</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-N101A-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	N101A
<b>pDF10</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-D122A-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	D122A
<b>pDF11</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-Y170A-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Y170A
<b>pDF12</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-N275A-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	N275A
<b>pDF13</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-D322A-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	D322A
<b>pDF14</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-F297A-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	F297A
<b>pDF15</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-d239-249-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	Δ239-248
<b>pDF16</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-E292S-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	E292S
<b>pDF17</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-EE342/342S-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	EE342/343S
<b>pDF18</b>	pET21a-CPD	pET21a-DAIP-S276C-CPD-His	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	S276C
<b>pDF19</b>	pET22b(+)	pET22b-DAIP-His <sub>6</sub>	DAIP <sub>opt</sub> ( <i>S. mobaraensis</i> )	-
<b>Bacillolysin</b>				
<b>pMR1</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Bacillolysin-His	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	-
<b>pMR2</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Bacillolysin-StrepII	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	-
<b>pMR2</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Bacillolysin-G5C-N58C-His	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	G5C-N58C
<b>pMR3</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Bacillolysin-D55N-His	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	D55N
<b>pMR4</b>	pACYC-Duet-1	pACYC-nSP-Pro-pelB-Bacillolysin-His	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	-
<b>pMR5</b>	pACYC-Duet-1	pACYC-nSP-Pro-pelB-E138A-His	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	E138A
<b>pMR6</b>	pET21a-CPD	pET21a-Propeptide(npr)-CPD-His	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	-
<b>pMR7</b>	pET22b(+)	pET22b-Propeptide(npr)-His	npr ( <i>P. polymyxa</i> DSM-36)	-
<b>Aureolysin</b>				
	pUC57	pUC57-Aur_opt	aur <sub>opt</sub> ( <i>S. aureus</i> )	-
<b>pSAA1</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Pro-Aur-His	aur <sub>opt</sub> ( <i>S. aureus</i> )	-
<b>pSAA2</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-His-Pro-Aur	aur <sub>opt</sub> ( <i>S. aureus</i> )	-
<b>pSAA3</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Pro-Aur-E144A-His	aur <sub>opt</sub> ( <i>S. aureus</i> )	E144A
<b>pSAA4</b>	pACYC-Duet-1	pACYC-nSP-Pro-pelB-Aur-E144A-His	aur <sub>opt</sub> ( <i>S. aureus</i> )	E144A
<b>Pseudolysin</b>				
	pUC57	pUC57-L-E141A_opt	lasB <sub>opt</sub> -(LOF) ( <i>P. aeruginosa</i> )	E141A
<b>pSAP1</b>	pACYC-Duet-1	pACYC-nSP-Pro-pelB-Pseudo-E141A-His	lasB <sub>opt</sub> -(LOF) ( <i>P. aeruginosa</i> )	E141A
<b>pSAP2</b>	pACYC-Duet-1	pACYC-nSP-Pro-pelB-Pseudo-E141A	lasB <sub>opt</sub> -(LOF) ( <i>P. aeruginosa</i> )	E141A
<b>Thermolysin</b>				
	pUC57	pUC57-Tln_opt	nprT <sub>opt</sub> ( <i>B. thermoproteolyticus</i> )	-
<b>pSAT1</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Pro-Tln-His	nprT <sub>opt</sub> ( <i>B. thermoproteolyticus</i> )	-
<b>pSAT2</b>	pET22b(+)	pET22b-nSP-Pro-Tln	nprT <sub>opt</sub> ( <i>B. thermoproteolyticus</i> )	-
<b>pSAT3</b>	pACYC-Duet-1	pACYC-nSP-Pro-pelB-Tln-E143A-His	nprT <sub>opt</sub> ( <i>B. thermoproteolyticus</i> )	E143A
<b>pSAT4</b>	pACYC-Duet-1	pACYC-nSP-Pro-pelB-Tln-E143A	nprT <sub>opt</sub> ( <i>B. thermoproteolyticus</i> )	E143A

<sup>a</sup> Nukleotid-Sequenz: siehe Anhang

Gen <sup>a</sup>	Signalpeptid nt (AS)	Propeptid nt (AS)	reifes Enzym/Protein nt (AS)	Plasmid nt (AS)
DAIP <sub>opt</sub>	-77-0 (-26-0) <sup>b</sup>	-	1-1047 (1-349)	pDF1-18
aur <sub>opt</sub>	1-81 (1-27)	82-628 (28-209)	629-1529 (210-509)	pSAA1-4
lasB <sub>opt</sub>	1-69 (1-23)	70-591 (24-197)	592-1494 (198-498)	pSAP1-2
npr	1-72 (1-24)	73-858 (25-286)	859-1770 (287-590)	pMR1-7
nprT <sub>opt</sub>	1-84 (1-28)	85-696 (29-232)	697-1644 (233-548)	pSAT1-4

<sup>a</sup> Nukleotid-Sequenz: siehe Anhang; <sup>b</sup> nicht dargestellt, da unverwendet

Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt im Rahmen dieser Arbeit anhand des reifen Enzyms bzw. Proteins!

### 3.1.7. Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz
<b>rBacillolysins</b>	
Bac_E138A_rev	gacaccatgtgtaagcgcacatgcctactacatc
Bac_E138A_fwd	gatgtagtagggcatgagccttacacatggtgtc
Bac_F300G_XhoI_rev	gcgcgccctcgaggcctacagcgccaccagacttagcagct
Bac_Mat-His_XhoI_rev	gcgcgccctcgagtcagtggtggtggtggtggtggttcgaggcctacagcgccaccagac
Bac_mat_DEL_NcoI_rev	cagtaacgcgcgtggaagtacc
Bac_mat_DEL_NcoI_fwd	ggtactttccacggcggttactg
Bac_NcoI_fwd	gcgcgcccatggagagttccgtttcgg
Bac_NdeI_fwd	gcgcgcccatatggagagttccgtttcgg
Bac_Pro-G_NcoI_fwd	gcgcgcccatggggaaaaaagtatggttttc
Bac_Pro_BamHI_rev	gcgcgcgcatcctcaaagtatgtcactactggaatac
Bac_XhoI_rev	gcgcgccctcgaggcctacagcgccaaaagacttagcagct
Bac-Propep_XhoI_rev	gcgccctcgagaatgatgtcactactgg
Bac-StrepII(F6A)_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcattttctccgctgcgatgggtccacgcgctgcctacagcgctcacc
Bac-StrepII_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcattttctcaaactgcgatgggtccacgcgctgcctacagcgctcacc
Bac_D55N_rev	ccatacattatcagcggtttgtcaaaagggtgcc
Bac_D55N_fwd	ggcacccttttgacaaacgctgataatgtatgg
Bac_G5C_rev	cacacctttacctgtgcatgtcgcttcattaatg
Bac_G5C_fwd	cattaatgaagcgacatgcacaggtaaagggtgtg
Bac_LE-StrepII_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcattttctcaaactgcgatgggtccattcgaggcctacagcgctc
Bac_N58C_rev	gctggatcattccatacgaatcagcatctgtc
Bac_N58C_fwd	gacagatgctgattgcgtatggaatgatccagc
nSP-Bac_NdeI_fwd	gcgcgcccatatgaaaaaagtatggttttc
Sequ.-Primer_mature_middle_rev	ccgatgacgtccgagaaagc
Sequ.-Primer_mature_middle_fwd	gagagtcgggtgcattgaatg
Sequ.-Primer_propept_middle_rev	gtgcagctgcttcttttatatgc
Sequ.-Primer_propept_middle_fwd	ctccaaaaatcagcgcttctg
T7_rev	gctagtattgtctcagcgg
T7_fwd	taatacgactcactatagg
Bac_NcoI_fwd	gcgcgcccatggagagttccgtttcgg
Bac_NdeI_fwd	gcgcgcccatatggagagttccgtttcgg
Bac_nSP-Pro-G_NcoI_fwd	gcgcgcccatggggaaaaaagtatggttttc
Bac_pelB-Mat_I_fwd	ccagccggcgatggccaatgaagcgacaggc
Bac_pelB-Mat_II_fwd	cgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatgg
Bac_pelB-Mat_III_fwd	gcgcgcccatatgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtc
Bac_Pro_BamHI_rev	gcgcgcgcatcctcaaagtatgtcactactggaatac
npr-Propep_XhoI_rev	gcgccctcgagaatgatgtcactactgg
npr_Mat-His_XhoI_rev	gcgcgccctcgagtcagtggtggtggtggtggtggttcgaggcctacagcgccaaaagacttagca
nSP-Bac_NdeI_fwd	gcgcgcccatatgaaaaaagtatggttttc
P1_pACY_rev	gattatgcggccgtgtacaa
P1_pACY_fwd	gagcggataacaattcccctg
P2_pACY_fwd	ttgtacacggccgcataatc



Name	Sequenz
<b>DAIP</b>	
CPD_rev	cgtcagtgggtcggtgtcac
DAIP_D122A_fwd	cgcagcgccgcgattgtcggcggtgggtac
DAIP_D122A_rev	gccgacaatcgcggcgcctcggagagc
DAIP_d239-248_fwd	ctctgggtattgacctggtttctggtcgtcatctgtaccgc
DAIP_d239-248_rev	agaaaccaggtcaatacccagagcg
DAIP_D267A_NEW_fwd	cgcgcacgtggatgcaacgcggacaccgaac
DAIP_D267A_NEW_rev	gttcggtgtccggcggttgcacccacgatgcgcg
DAIP_D267N_fwd	cgcgcacgtggataaacgcggacaccgaac
DAIP_D267N_rev	gttcggtgtccggcggttgcacccacgatgcgcg
DAIP_DEL_HH347/48_XhoI_rev	gcgcgcctcgagaatttgaacttcttccagacc
DAIP_E247A_fwd	cgaactcaggcgcggcgggtcgtcatctgtacc
DAIP_E247A_rev	ggtacagatgacgacccgcgcgcctgagttcg
DAIP_E272A_fwd	cgcgcgacaccgcgcgtgacgaactcaacc
DAIP_E272A_rev	gggttgagttcgtcagcgcggtgtccggcg
DAIP_E342A_XhoI_rev	gcgcgcctcgagatggtgaatttgaacttctgccagaccagatacataac
DAIP_E343A_XhoI_rev	gcgcgcctcgagatggtgaatttgaactgcttccagaccagatacataac
DAIP_EE342/343S_fwd	gttatgtatctgggtctgtcagttcaaattcaccatc
DAIP_EE342/343S_rev	gatggtgaatttgaactgacagaccagatacataac
DAIP_F297A_fwd	ggcacctatgcccaagcgtatggcacc
DAIP_F297A_rev	catacgcttgggcataggtgccgtattc
DAIP_GT36/37EE_fwd	gctggcaccgaccacggaagaactgcagagtgtttcc
DAIP_GT36/37EE_rev	ggaaacactctgcagttcttccgtgggtcgggtgccagc
DAIP_N101A_fwd	ctgggagaaaagcgggcggttatctggcac
DAIP_N101A_rev	gataaccgcccgcctttctcccaggcaaac
DAIP_N275A_fwd	cgaactgacggcgctcaaccctgctggcac
DAIP_N275A_rev	gcagggttgacgcgcgtcagttcgggtgtc
DAIP_NdeI_fwd	gcgcgcctatggcagattcaacgagc
DAIP_TL37/38YF_fwd	ggcaccgaccacgggttatttccagagtgtttcctacac
DAIP_TL37/38YF_rev	gtgtaggaaaacactctggaaataacccgtggtcgggtgcc
DAIP_XhoI_rev	gcgcgcctcgagatggtgaatttgaacttcttcc
DAIP-D322A_fwd	cataatgccacgcgggcattagcgcgatcg
DAIP-D322A_rev	gcgcctaagcccgcgtgggcattatgggttttac
DAIP-E99A_fwd	ttgcctgggcgaaaaaacggcggttattc
DAIP-E99A_rev	gccgtttttcgcccaggcaaacgcacg
DAIP-E292S_fwd	gaatgttctgtatttttcatacggcacctattttcc
DAIP-E292S_rev	ggaaataggtgccgtatgaaaaatacagaacattc
DAIP-S276C_fwd	ccgaactgacgaactgcaccctgctggcacccg
DAIP-S276C_rev	cgggtgccagcagggtgcagttcgtcagttcgg
DAIP-Y170A_fwd	gctagtgttgcgaccgtctccttcgatc
DAIP-Y170A_rev	gaaggagacggtcgcaacactagcacccgg
Q144N_fwd	ggcagcgatggtaatctgtacgattctacgg
Q144N_rev	ccgtagaatcgtagattaccatcgctgcc
Q298N_fwd	cacctatttcaatgcgtatggcacccgatctg
Q298N_rev	cagatcgggtgccatacgcattgaaatagggtg
Q345N_rev	gtgctcgagatggtgaatattaacttcttcc
Q39N_fwd	acgggtaccctgaatagtgtttcctacacgc
Q39N_rev	gcgtgtaggaaacactattcagggtaccctg
Q65N_fwd	gatgaactgaatcgttccaccgacgcaggttgc
Q65N_rev	ggtggaacgattcagttcatcattgtgggt
<b>rAureolysin</b>	
Aur_A144E_fwd	gatgtggttgcccatgaaattaccacaggtgtg
Aur_A144E_rev	cacaccgtgggtaatttcatgggcaaccacatc
Aur_XhoI_rev	gcgcgcctcgagttccacgccaaacttc
Aur-Pro_BamHI_rev	gcgcgcggtacctcatgcttctttaaccagattgg
Aur-SE-His_XhoI_rev	gcgcgcctcgagtcagtggtggtggtggtggttcagattccacgccaaacttc



Name	Sequenz
Aur-Stopp_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcattccacgccaacttc
Conf.-HisProAur	atcaccacggctctagt
NdeI_His-ProAur_fwd	gcgcgcatatgcatcatcaccatcaccacggctctagtataccaatcataaacc
pelBI-Aur_fwd	cccagccggcgatggccgcagccaccggcaccg
<b>rPseudolysin</b>	
Els-Pro_BamHI_rev	ggatcctcaatgtgccagaccttcccac
Els-SE-His_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcagtggtggtggtggtggttcagacagtgcaactcgggcag
Els_STOPP_XhoI_rev	atatgctcgagtcacagtgcaactcgggcaggtc
Els_XhoI_rev	atatactcgagcagtgcaactcgggcag
NcoI_G_nSP-Els_fwd	gcgcgcccatggggaagaaggttagcacccctgg
NdeI_nSP-Els_fwd	gcgcgccatataagaaggttagcacccctgg
pelBI_Els_fwd	gcccagccggcgatggccgcagaagccggcggtc
pelB_rev	ggccatcgccggctgggcag
<b>rThermolysin</b>	
His_XhoI_rev	atatactcgagtcagtggtggtggtg
His_XhoI_rev	atatactcgagtcagtggtggtggtg
NcoI_G-Tln_fwd	gcgcgccatggggaagatgaagatgaaactggc
NdeI_Tln_fwd	gcgcgccatataagatgaagatgaaactggc
pelB-III-Tln-Mat_fwd	gctgcccagccgctgctgctggtctg
pelB-II-Tln-Mat_fwd	cgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcgatgg
pelB-I-Tln-Mat_fwd	cccagccggcgatggccattaccggtaccagcaccg
Tln_XhoI_rev	gcgcgctcgagtttcacaccaactgcac
Tln-E143A_fwd	ggcccatgcactgaccatgccgttac
Tln-E143A_rev	catgggtcagtgcatgggccaccacatc
Tln-His_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcagtggtggtggtggtggttcagatttcacaccaactgcac
Tln-Pro_BamHI_rev	gcgcgggatcctcagcttttcacgtcaccg
Tln-SE-His_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcagtggtggtggtggtggttcagatttcacaccaactgcac
Tln-STOPP_XhoI_rev	gcgcgctcgagtcatttcacaccaactgcac

### 3.1.8. Puffer und Lösungen

Einsatzgebiet	Bezeichnung	Zusammensetzung	
Zellaufschluss	Aufschlusspuffer	50 mM	Tris-HCl pH 7.5
		300 mM	NaCl
		(2 mM	CaCl <sub>2</sub> )
Agarose-Gelelektrophorese	TAE-Puffer	40 mM	Tris pH 8.5
		20 mM	Essigsäure
		1 mM	EDTA
	DNA-Auftragspuffer (6×)	10 mM	Tris-HCl pH 8.5
		0.03% (w/v)	Bromphenolblau
		60% (v/v)	Glycerin
SDS-PA-Gelelektrophorese	SDS-Elektrophoresepuffer	60 mM	EDTA
		25 mM	Tris pH 8.9
		192 mM	Glycin
	CBB-Färbelösung	1% (w/v)	SDS
		0.25% (w/v)	Coomassie blue R-250 in ddH <sub>2</sub> O
		0.25% (w/v)	Coomassie blue G-250 in Ethanol
	CBB-Entfärbelösung	10% (v/v)	Essigsäure
		40% (v/v)	Ethanol
		10% (v/v)	Essigsäure

Einsatzgebiet	Bezeichnung	Zusammensetzung	
	5x red. Auftragspuffer m. <u>EDTA/Phenanthrolin</u>	310 mM 10% (w/v) 0.1% (w/v) 50% (v/v) 50 mM 50 mM 25 mM	Tris-HCl pH 6.8 SDS Bromphenolblau Glycerol <i>Dithiotreitol</i> <u>EDTA</u> <u>1,10-Phenanthrolin</u>
Western Blot	Transferpuffer	48 mM 39 mM 1.3 mM 20% (v/v)	Tris pH 9.1 Glycin SDS Methanol
		<i>Odyssey Blocking Buffer</i>	in PBS
		Phosphate buffered saline (PBS)	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.4 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 2.7 mM KCl
		PBS-T	wie PBS mit 0.1% (v/v) Tween 20

### 3.1.9. Kultivierungsmedien

Die Sterilisation der Kultivierungsmedien erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Hitzeempfindliche Substanzen wurden durch 0.22 µm sterilfiltriert (SF). Zum Gießen von Kultivierungsplatten wurde den Medien 1.5% (w/v) Agar-Agar zugegeben.

Medium	Zusammensetzung	
LB-Medium	10 g*l <sup>-1</sup> 5 g*l <sup>-1</sup> 10 g*l <sup>-1</sup>	Pepton Hefeextrakt NaCl
doubleYeastTryptone (dYT)-Medium	20 g*l <sup>-1</sup> 10 g*l <sup>-1</sup> 10 g*l <sup>-1</sup>	Pepton Hefeextrakt NaCl
SB-Medium	32 g*l <sup>-1</sup> 20 g*l <sup>-1</sup> 10 g*l <sup>-1</sup>	Pepton Hefeextrakt NaCl
Autoinduktions-Medium	10 g*l <sup>-1</sup> 5 g*l <sup>-1</sup> 10 g*l <sup>-1</sup> 0.45 g*l <sup>-1</sup> 4.5 g*l <sup>-1</sup> 1.2 g*l <sup>-1</sup> 22 mM 17.3 mM 1.8 mM	Pepton Hefeextrakt NaCl Glucose (SF) Glycerol Lactose (SF) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub>

Medium	Zusammensetzung	
SOC-Medium (SF)	5 g*l <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
	20 g*l <sup>-1</sup>	Pepton
	3.6 g*l <sup>-1</sup>	Glucose
	2.5 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
Komplex-Medium (pH 7.0) für <i>S. mobaraensis</i> (supplementiert mit 1 ml Spurenelementlösung nach Voelskow pro 110 ml Medium)	10 g*l <sup>-1</sup>	Stärke
	1 g*l <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2 g*l <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1 g*l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	1 g*l <sup>-1</sup>	NaCl
	2 g*l <sup>-1</sup>	CaCO <sub>3</sub>
	20 g*l <sup>-1</sup>	Pepton
	2 g*l <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
	10 g*l <sup>-1</sup>	D-Glucose x H <sub>2</sub> O
Spurenelementlösung nach Voelskow (SF) <sup>[189]</sup>	4 g*l <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	1 g*l <sup>-1</sup>	Fe(III)-Citrat x H <sub>2</sub> O
	200 mg*l <sup>-1</sup>	MnSO <sub>4</sub>
	100 mg*l <sup>-1</sup>	ZnCl <sub>2</sub>
	40 mg*l <sup>-1</sup>	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	30 mg*l <sup>-1</sup>	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	30 mg*l <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	60 mg*l <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>
GYM-Medium (pH 7.2)	4 g*l <sup>-1</sup>	D-Glucose x H <sub>2</sub> O
	4 g*l <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
	10 g*l <sup>-1</sup>	Malzextrakt
	2 g*l <sup>-1</sup>	CaCO <sub>3</sub>

### 3.1.10. Chromatographiesäulen und -materialien

Trennprinzip	Material/Typ	Hersteller/Vertrieb
AEXC	Fractogel EMD TMAE	Merck, Darmstadt
	DEAE-Sephadex	Sigma-Aldrich, Steinheim
CEXC	Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Merck, Darmstadt
GDF	Sepharose-TETA-Gly-DPhe	Diese Arbeit, Darmstadt
GPC	Hiload Superdex 75 pg 16/600 (#17104401)	GE Healthcare, Solingen
	Superdex 200 increase 3.2/300(#28-9909-46)	GE Healthcare, Solingen
HIC	Phenyl-Sepharose	GE Healthcare, Solingen
	HiTrap Phenyl HP	GE Healthcare, Solingen
IMAC	Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, Solingen
	HiTrap HP	GE Healthcare, Solingen

### 3.1.11. Geräte

Gerätebezeichnung	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 75S HP	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	TH-30	Edmund Bühler, Hechingen
	SM-30	Edmund Bühler, Hechingen
Chromatographieanlagen	Äkta Prime plus	GE Healthcare, Solingen
	BiologicLP	Bio-Rad, München
	LaChrom L-7200	Hitachi, Krefeld
	Agilent 1200 HPLC	Agilent, Waldbronn
Elektrophoresekammer	VWR 101202 102	VWR, Darmstadt
	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
Erlenmeyer-Schikanekolben	100 ml, 250 ml, 500 ml, 2000 ml	Glasgerätebau Ochs, Bovenden
Fluoreszenzspektrometer	F-7000	Hitachi, Krefeld
Gefriertrocknungseinheit	ALPHA 1-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanl. GmbH, Osterode
Geldokumentation	Odyssey SA Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen
	E-BOX CX5 TS	VWR, Darmstadt
Kalorimeter	Microcal PEAQ-ITC	Malvern, Herrenberg
Kultivierungskolben	Ultra Yield, 2500 ml	Thomson Instrument Company, Oceanside, CA (USA)
Küvette	$\mu$ Cuvette G 1.0	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette	Research 10-100 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
MTP-Reader	Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
	PHERASstar Plus	BMG Labtech, Ortenberg
	POLARStar Optima	BMG Labtech, Ortenberg
Multipette	Stream	Eppendorf, Hamburg
nanoDSF-Gerät	Prometheus NT.48	Nanotemper Technologies, München
pH-Elektrode	blueline 14pH	SI Analytics, Mainz
Pipetten	Research (10, 100, 1000, 5000 $\mu$ l)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Photospektrometer	Biospectrometer basic	Eppendorf, Hamburg
Spectropolarimeter	j-815 CD	Jasco, Easton, MD (USA)
Sterilwerkbank	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Stromgeber	EPS 600	Pharmacia Biotech, Schweden
	VWR Power Source 250 V	VWR, Darmstadt
Thermomixer	ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg
	ThermoMixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T Gradient	Biometra, Göttingen
Ultraschallstab	Digital Sonifier 25C	Branson Ultrasonics Corp., Danbury
Waagen	Adventurer Feinwaage	Ohaus, Nänikon, CH
	Explorer Analysenwaage	Ohaus, Nänikon, CH
Western-Blot-Apparatur	Trans Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
Zentrifugen	3K30C	Sigma, Taufkirchen
	6-16K	Sigma, Taufkirchen
	1-15K	Sigma, Taufkirchen
	MiniSpin	Eppendorf, Hamburg

### 3.1.12. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Konzentrator	Vivaspin (MWCO: 10k) Amicon (MWCO: 10k)	Sartorius, Göttingen Merck, Darmstadt
Dialyseschläuche	SERVAPOR® HMF (MWCO: 5k; 12k)	Serva, Heidelberg
Entsalzungssäule	PD midiTrap G-25-Säule	GE Healthcare, Solingen
Küvetten	1 ml Einweg-Küvetten (halb-mikro) 1 ml Einweg-UV-Küvetten (mikro)	Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte	96-Well Flat-Bottom Half Area	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl 5000 µl	Sarstedt, Nümbrecht VWR, Darmstadt
PVDF-Membran	Immobilon-FL	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäße	1.5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
serologische Pipetten	5 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun, Melsungen
Spritzen-Sterilfilter	0.22 µm, 0.45 µm Vakuumfilter Express Plus 0.22 µm	Sarstedt, Nümbrecht Millipore, Billerica US-MA
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml 50 ml (20.000 x g)	Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht

## 3.2. Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1. Sterilisation

Kulturmedien, andere hitzestabile Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Flüssigkeiten wurden über einen 0.22 µm Filter sterilfiltriert. Arbeitsflächen sowie temperaturempfindliches Zubehör wurden mit 70% (v/v) 2-Propanol desinfiziert.

### 3.2.2. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch (BioSpectrometer basic, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) am BioSpectrometer basic der Firma Eppendorf in 1-ml-Küvetten ermittelt. Als Referenz diente zellfreies Medium.

### 3.2.3. Submerskultivierung von *E. coli* zur Proteinproduktion

Zur Produktion der unterschiedlichen Zielproteine wurden, wenn nicht anders beschrieben, *E. coli*-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid aus einer Kryokonserven oder in Form eines Einzelklons direkt von einer LB-Platte in 50-100 ml LB-Medium bei 37 °C und 150 rpm als Vorkultur ü. N. kultiviert. Damit wurde am Folgetag die Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0.1 inokuliert und bis zu einem OD-Wert von 0.6-1.5, abhängig vom Kultivierungskolben, bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Proteinproduktion wurde bei 25 °C durch die Zugabe von 10-500 µM IPTG gestartet. Die Induktionsdauer lag abhängig vom produzierten Protein zwischen 2 h und 16 h.

### 3.2.4. Submerskultivierung von *S. mobaraensis* zur Proteinproduktion

Zur Herstellung von Submerskulturen für die Produktion des inaktivierenden Proteins DAIP oder *Sm*-TG wurden 1 l Erlenmeyer-3-Schikane-Kolben mit 110 ml Komplex-Medium befüllt und nach dem Autoklavieren über einen 0,22 µm Sterilfilter mit 1 ml Spurenelementlösung nach Voelskow *et al.* versetzt. <sup>[189]</sup> Jeder Kolben wurde mit ca. 1 cm<sup>2</sup> einer bewachsenen GYM-Agar-Platte (14-40 d) inokuliert und für 48 h (DAIP) und 72-96 h (*Sm*-TG) bei 28 °C und 110 rpm inkubiert.

Zur Produktion des inaktivierenden Proteins DAIP oder *Sm*-TG erfolgte zunächst die Plattenkultivierung von *S. mobaraensis* auf *Glucose-Yeast-Malt* (GYM)-Platten mit 1.5% (w/v) Agar-Agar zwischen 14-40 d bei 28 °C. <sup>[190]</sup> Für die Submerskultivierung wurden 1 l Erlenmeyer-3-Schikane-Kolben mit 110 ml Komplex-Medium befüllt und nach dem Autoklavieren über einen 0,22 µm Sterilfilter mit 1 ml Spurenelementlösung nach Voelskow *et al.*, 1989, versetzt (3.1.9). <sup>[189-191]</sup> Jeder Kolben wurde dafür mit ca. 1 cm<sup>2</sup> einer bewachsenen GYM-Agar-Platte inokuliert und im Anschluss für 48 h (DAIP) und 72-96 h (*Sm*-TG) bei 28 °C und 110 rpm inkubiert.

### 3.2.5. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen für die Aufnahme von Donor-DNA über Hitzeschock-Transformation wurde die CaCl<sub>2</sub>-Methode nach Inoue, 1990, verwendet. <sup>[192]</sup> Das Verfahren basiert auf der gesteigerten Permeabilität der prokaryontischen Zellmembran für die Aufnahme von Fremd-DNA in Anwesenheit von bivalenten Calcium-Ionen. Die Durchführung erfolgte entsprechend Tab. 3.1 und Tab. 3.2.

Tab. 3.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	
Kultivierung einer 5-ml-Vorkultur in LB-Medium ü. N. bei 37 °C	
Inokulation von 250 ml TYM-Medium und Kultivierung bis OD <sub>600</sub> von 0.5-0.6	
Zentrifugation bei 4200 <i>g</i> und 4 °C für 15 min	
Zellpellet in 50 ml Tfb1 (4 °C) resuspendieren	
Zentrifugation bei 4200 <i>g</i> und 4 °C für 15 min	
Zellpellet in 15 ml Tfb2 (4 °C) resuspendieren	
Aliquotieren, Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80 °C	

Tab. 3.2 Sterile Lösungen zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Lösung	Zusammensetzung	
Tfb1 (pH 5.8)	30 mM	Kaliumacetat
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	15% (w/v)	Glycerin
Tfb2 (pH 7.0)	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	KCl
	15% (w/v)	Glycerin



### 3.2.6. Zellernte

#### *E. coli*

Bei der rekombinanten Produktion mit *E. coli* wurde die Kulturbrühe zur Trennung von Medium und Zellen für 10 min bei 13,000 *g* bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit Aufschlusspuffer (2.1.7.) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### *S. mobaraensis*

Anders als *E. coli* sezerniert *S. mobaraensis* DAIP und Sm-TG direkt in das Kulturmedium. Nach Abbruch der Kultivierung wurde das Kulturmedium durch Vakuumfiltration über einen Büchnertrichter abgetrennt. Das Filtrat wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder nach Ansäuern auf pH 6.0 bei -20 °C gelagert.

### 3.2.7. Ultraschall-Zellaufschluss

Zur Freisetzung der produzierten Proteine aus *E. coli*-Zellen wurde die Ultraschallaufschlussmethode angewendet.

Das frische bzw. aufgetaute Zellsediment wurde hierfür, wenn nicht anders beschrieben, in Aufschlusspuffer (vgl. 2.1.7.) resuspendiert (ca. 4 ml pro g Zellsediment) und mit einem Ultraschallstab (SONOPLUS) viermal 3 min in einer 40 ml Rosettenzelle auf Eis aufgeschlossen (Tab. 3.3). Nach dem Aufschluss wurden unlösliche Proteine und Zellfragmente bei 20,000 *g* für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vor der weiteren Aufarbeitung sterilfiltriert (0.22 µm).

Tab. 3.3 Programm für den Ultraschallaufschluss von *E. coli*-Zellen

Ultraschallstab-Programm	
Dauer	4*3 min
Amplitude	25%
Puls	0.5 sek
Pause	0.5 sek

## 3.3. Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1. Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden die jeweiligen Klone, welche das gewünschte Plasmid tragen, in 5 ml LB-Medium ü. N. bei 37 °C inkubiert. Isolation und Elution der DNA erfolgten entsprechend den Herstellervorgaben mit dem *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* entweder in sterilem ddH<sub>2</sub>O oder Elutionspuffer. Bis zur weiteren Verwendung wurden alle Plasmid-Proben bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer DNA-Probe lässt sich durch UV-Absorptionsbestimmung bei 260 nm und 280 nm ermitteln, wobei das Verhältnis beider Werte ein Maß für die Reinheit ist. Der Quotient ( $A_{260}/A_{280}$ ) sollte

zwischen 1.8 und 2 liegen, da niedrigere Werte auf Verunreinigungen durch in der Regel Proteine, welche bei 280 nm absorbieren, zurückzuführen sind. Die Bestimmung erfolgte an einem UV/Vis-Spektralphotometer (BioSpectrometer basic, Eppendorf) mit einer  $\mu$ Cuvette G1.0 und sterilem ddH<sub>2</sub>O als Referenz.

### 3.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und/oder Reinigung von DNA-Proben wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt, welche die Auftrennung der DNA-Moleküle anhand der Größe ermöglicht. Nach Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Moleküle zur Anode, wobei Agarose-Konzentration, Spannung und Laufstrecke die Auflösung bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden standardmäßig 1.5%-Agarose-Gele in TAE-Puffer bei 120 V verwendet. Die Trennung benötigte üblicherweise 30 min.

Zur Visualisierung der DNA wurden beim Gießen des Gels 0.002% (v/v) des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs *Midori Green Advance* zugegeben, welcher bei 320 nm angeregt wird. DNA-Proben wurden entsprechend mit 6xDNA-AP verdünnt und zusammen mit dem DNA-Größenstandard *GeneRuler 1kB* in die Kavitäten des Gels gegeben. Die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht analysiert, ggf. ausgeschnitten und mit dem *FastGene Gel/PCR Extraction Kit* gereinigt.

### 3.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

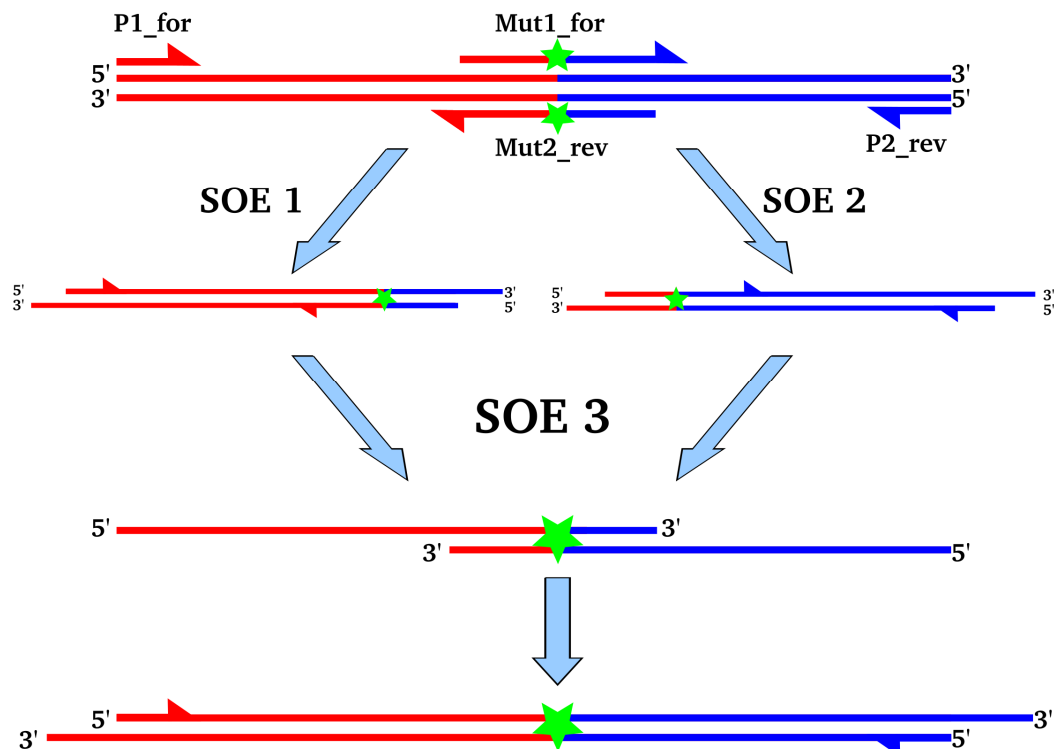
Seit ihrer Entwicklung durch Mullis *et al.* im Jahr 1986 ist die Polymerasekettenreaktion eine molekularbiologische Standardmethode zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA und Nachweis spezifischer DNA-Segmente. <sup>[193]</sup> Die sog. Kolonie-PCR ermöglicht so die Identifikation von Einzelkolonien, welche das gewünschte DNA-Segment nach einer Transformation tragen. Hierbei wurde zunächst ein Abstrich der Kolonie angelegt und deren Überstand nach Erhitzen und Zentrifugation als Matrice für eine PCR mit einem spezifischen Primer-Paar eingesetzt. Positive Klone zeigten nach Analytik über Agarose-Gelelektrophorese eine signifikante Bande auf der Höhe des gesuchten Fragments. Ein typischer Ablauf einer PCR ist in Tab. 3.4 dargestellt. Für analytische Zwecke wie die Kolonie-PCR wurde eine *TAQ*-Polymerase verwendet. Für präparative Ansätze wurde hingegen aufgrund der *Proof-reading*-Funktion und geringeren Fehlerrate die *Phusion* DNA-Polymerase (NEB) eingesetzt.

Tab. 3.4 Standard-Thermocycler-Programm zur Durchführung einer PCR mit *Phusion*-Polymerase

Thermocycler-Programm		
Temperatur	Schritt	Zeit
98 °C	Initial-Denaturierung	120 sek
98 °C	Denaturierung	30 sek
T <sub>m</sub> -5 °C	Annealing	30 sek
72 °C	Elongation	entspr. der Amplifikat-Länge (2 kbp*min <sup>-1</sup> )
72 °C	finale Elongation	5 min
4 °C	Aufbewahrung	∞

## Ortspezifische Mutagenese über *size overlap extension* (SOE)-PCR

Die ortsspezifische Mutagenese ist eine Methode zur gezielten Veränderung einzelner oder mehrerer Nukleotide innerhalb eines doppelsträngigen DNA-Fragments mittels PCR. In dieser Arbeit wurde hierfür die sog. *size overlap extension*-PCR (SOE-PCR) verwendet. Dabei wird das Ziel-DNA-Segment zunächst über vier, zwei äußere und zwei innere, Primer als zwei getrennte DNA-Fragmente mittels separater PCR vervielfältigt (SOE 1/SOE 2, Abb. 3.2).



**Abb. 3.2** Schematische Darstellung des Ablaufs einer ortsspezifischen Mutagenese über SOE-PCR.

Diese sind jeweils am 3' bzw. 5'-Ende homolog. In dem überlappenden Bereich werden so über die verwendeten Oligonukleotide die gewünschten Veränderungen eingefügt. Im abschließenden Schritt werden die generierten Fragmente als Vorlage für eine dritte PCR verwendet, wobei nur noch die äußeren Oligonukleotide eingesetzt werden (SOE 3). So erhält man letztlich das DNA-Segment, welches die gewünschte Mutation enthält.

**Tab. 3.5** Pipettierschema einer ortsspezifischen Mutagenese über SOE-PCR

	SOE 1	SOE 2	SOE 3
5x Phusion-Polymerase-Puffer	10 µl	10 µl	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl
äußerer Primer <i>P1</i> (10 µM)	2.5 µl	-	2.5 µl
innerer Primer <i>Mut1</i> (10 µM)	-	2.5 µl	-
innerer Primer <i>Mut2</i> (10 µM)	2.5 µl	-	-
äußerer Primer <i>P2</i> (10 µM)	-	2.5 µl	2.5 µl
<i>Phusion</i> -Polymerase	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Ausgangsplasmid-DNA (10 ng/µl)	1 µl	1 µl	-
SOE 1-Amplifikat (10 ng/µl)	-	-	1 µl
SOE 2-Amplifikat (10 ng/µl)	-	-	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	32.5 µl	32.5 µl	31.5 µl

Die Durchführung einer SOE-PCR erfolgte anhand des Pipettierschemas in Tab. 3.5 unter Verwendung des Standard-Thermocycler-Programms in Tab. 3.4. Die zur Amplifikation benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers GmbH (Ulm) synthetisiert.

### 3.3.5. Restriktion von DNA

Die meisten Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats Strangbrüche mit spezifischen Überhängen generieren (*sticky ends*). Plasmid-DNA kann so leicht linearisiert werden, was für weitere Klonierungsschritte eine Grundvoraussetzung darstellt. Alle Restriktionsansätze wurden in *CutSmart*-Puffer (NEB) gemäß Herstellerangaben durchgeführt (Tab. 3.6). In der Regel wurden Reaktionsansätze mit 35  $\mu$ l Volumen für die Vorbereitung von Plasmid- bzw. Insert-DNA bei 37 °C für 16 h inkubiert. Die Reinigung der Restriktionsansätze erfolgte anschließend über präparative Gelelution mit dem *FastGene Gel/PCR Extraction Kit* nach Herstellerangaben.

Tab. 3.6 Exemplarisches Pipettierschema zur Durchführung einer Restriktion

Restriktionsansatz (35 $\mu$ l)	
3.5 $\mu$ l	10x CutSmart-Puffer
1 $\mu$ l	<i>NdeI/NcoI</i>
1 $\mu$ l	<i>XhoI/BamHI</i>
25-29 $\mu$ l	Plasmid-/Insert-DNA
ad. 35 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O

### 3.3.6. Ligation von Plasmid-DNA

Bei der Ligation lässt sich durch enzymatische Verknüpfung des DNA-Rückgrats bspw. Fremd-DNA in ein gewünschtes Plasmid einführen. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäure-Segmente mit Hilfe einer ATP-abhängigen T4-Ligase unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelte und über Gelelution gereinigte Fremd- und Plasmid-DNA wurden in 20  $\mu$ l-Ansätzen entsprechend Tab. 2.2 bei 4 °C nach Herstellerangaben ü. N. ligiert und anschließend über Hitzeschock-Transformation (2.2.7.) in den Ziel-Stamm integriert.

Tab. 3.7 Exemplarisches Pipettierschema zur Durchführung einer Ligation

Ligationsansatz (20 $\mu$ l)	
2 $\mu$ l	10x T4-Ligase-Puffer
0.02 pmol	lin. Plasmid-DNA
0.06-0.1 pmol	Fremd-DNA
1 $\mu$ l	T4-DNA-Ligase
ad. 20 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O

### 3.3.7. Hitzeschock-Transformation

Mithilfe dieser Methode ist es möglich, Plasmide mit dem gewünschten Ziel-Gen und einer hohen Transformationseffizienz in chemisch-kompetente Zellen einzubringen. <sup>[192]</sup> Das Ablaufprotokoll hierzu kann Tab. 3.8 entnommen werden.

Tab. 3.8 Ablaufprotokoll der Hitzeschock-Transformation

Hitzeschock-Transformation
Auftauen der chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen auf Eis
2-5 $\mu$ l Plasmid + 50 $\mu$ l kompetente Zellen; Inkubation für 30 min auf Eis
Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C
Abkühlen auf Eis
Zugabe von 250 $\mu$ l 42 °C warmen SOC-Medium
Inkubation für 60 min bei 37 °C unter Schütteln (1100 rpm)
Zentrifugation für 3 min bei ca. 10 000 $\times$ g bei Raumtemperatur
Entnahme von 50 $\mu$ l Überstand, restlichen Überstand verwerfen
Präzipitat resuspendieren und auf LB-Agar Platten mit entspr. Selektionsmarker ausplattieren
Inkubation über Nacht bei 37 °C

### 3.3.8. DNA-Sequenzierung

Alle neu konstruierten Plasmide wurden durch Sequenzierung auf Identität an der LMU München überprüft. Etwa 150 ng Plasmid-DNA wurde mit jeweils 3.2 pmol eines geeigneten Primers versetzt und mit 10 mM Tris-HCl pH 8.5 vereinigt (Endvolumen von 7  $\mu$ l). Die Sequenzierung erfolgte nach dem Protokoll „Cycle, Clean and Run (Big Dye v 3.1)“, und die anschließende Auswertung der Rohdaten wurde mit *A plasmid Editor* 2.0.47 (ApE) durch Sequenzalignment durchgeführt.

## 3.4. Proteinchemische Methoden

### 3.4.1. Affinitätschromatographien

#### Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die IM-Affinitätschromatographie ist eine effiziente Methode zur Isolation rekombinanter Proteine, welche mit einem Hexa/Decahistidin-Tag fusioniert sind. Bei einer IMAC werden zweiwertige Übergangsmetallionen wie  $\text{Ni}^{2+}$  durch ein komplexierendes Trägermaterial immobilisiert. Die Imidazol-Ringe eines His-Tags binden das Zielprotein spezifisch an das Trägermaterial, dass nach einem Waschschrift durch Absenkung des pH oder Verdrängung mit Imidazol eluiert wird.

Zur Isolation der meisten rekombinanten Proteine wurden entweder HisTrap HP-Säulen oder, für Batchanwendungen, das freie Säulenmaterial *FastFlow Chelating Sepharose* der Firma GE Healthcare verwendet. Das sterilfiltrierte Lysat wurde dafür auf die zuvor mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladene und mit IMAC Puffer A äquilibrierte Säule gegeben und mit 10-20 Säulenvolumen (CV, *column volume*) Puffer A gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen (Tab. 3.9). Die Elution erfolgte, wenn

nicht anders beschrieben, mit einem linearen Gradienten über 10-30 CV mit 500 mM Imidazol (Tab. 3.10).

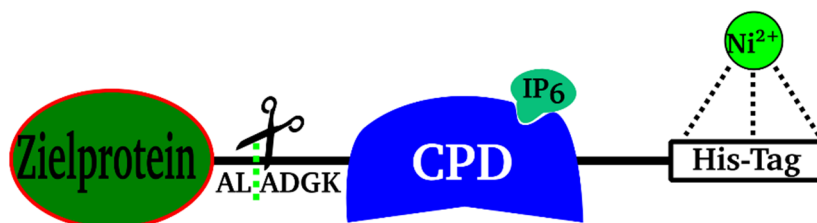
**Tab. 3.9 Ablaufprotokoll der immobilisierten Metallionen Affinitätschromatographie.** Die abweichenden Schritte der CPD-Reinigung sind *kursiv* dargestellt.

Auftragsvol. [CV]	Lösung	Flussrate [ml*min <sup>-1</sup> ]	Funktion
10	IMAC Puffer A	1-5	Äquilibration
variabel	Probenaufgabe	1-3	Proteinbindung
10-20	IMAC Puffer A	1-5	Elution unspezifisch geb. Proteine
15	<i>IMAC Puffer A mit 50 µM IP<sub>6</sub></i>	0.5	<i>CPD-Aktivierung</i> → <i>Elution des Zielproteins</i>
10-30 (lin. Gradient)	IMAC Puffer B	1-5	Elution des Zielproteins/ <i>Elution der CPD u. a.</i> <i>Verunreinigungen</i>

**Tab. 3.10 Zusammensetzung der IMAC-Puffer**

Zielprotein	IMAC Puffer A	IMAC Puffer B
rBacillolysin(-E138A), rThermolysin(-E143A), rPseudolysin-E141A	50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub>	50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM Imidazol
DAIP	50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl	50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Tag-freie DAIP-Varianten wurden zunächst als Fusionsprotein mit einer C-terminalen Cysteineprotease-Domäne (CPD) produziert, welche am C-Terminus einen Decahistidin-Tag trug (Abb. 3.3).<sup>[194]</sup> Nach Bindung an ein Ni<sup>2+</sup>-Material wurde durch Zugabe von Phytinsäure (IP<sub>6</sub>) die CPD aktiviert und das Zielprotein proteolytisch freigesetzt, wobei die CPD an der Säule gebunden blieb. Abschließend erfolgte die Elution unspezifisch gebundener Proteine sowie der CPD durch einen linearen Gradienten mit Imidazol. Alle Trennverfahren, mit Ausnahme der Größenausschlusschromatographie, wurden mit Anlagen des Typs BiologicLP (Bio-Rad) durchgeführt.



**Abb. 3.3 Schematische Darstellung der Reinigung eines CPD-Fusionsproteins.** Die CPD entfernt spezifisch das Zielprotein durch Hydrolyse der Peptidbindung im Sequenzmotiv ALADGK nach Aktivierung durch Phytinsäure (IP<sub>6</sub>).

Die einzelnen Fraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert, entsprechend vereinigt und dialysiert bzw. bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert.

### Proteinrückfaltungs (RF)-IMAC zur Isolation von rekombinantem Aureolysin

Die Produktion, Isolation und Reinigung von rekombinantem Aureolysin erfolgte mit leichten Modifikationen nach Nickerson *et al.*, 2008, durch Expression in *E. coli* als His<sub>6</sub>-Pro-Aureolysin und anschließender Rückfaltung direkt auf einer Ni<sup>2+</sup>-Säule. Der Aufschluss der Zellen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 50 mM Phosphat pH 7.4, 500 mM NaCl und 6 M Harnstoff (Tab. 3.11).



Das sterilfiltrierte Zelllysate wurde anschließend auf das im gleichen Puffer äquilibrierte IMAC-Säulenmaterial gegeben und gewaschen. Das gebundene Protein wurde dann durch Entfernung des Harnstoffs über zwei sukzessive lineare Gradienten von 6 M bis 1 M über das 50fache Säulenvolumen und 1 M bis 0 M rückgefaltet. Rückfaltung und autokatalytische Propeptidhydrolyse auf der Säule führten zur Elution des aktiven Enzyms. Das restliche gebundene Protein wurde abschließend mittels Imidazol freigesetzt.

**Tab. 3.11** Ablaufprotokoll der Proteinrückfaltungs-IMAC zur Isolation von rekombinantem Aureolysin.

Auftragsvol. [CV]	Lösung	Flussrate [ml*min <sup>-1</sup> ]	Funktion
10	50 mM Phosphat pH 7.4, 500 mM NaCl, 6 M Harnstoff	1-5	Äquilibrierung
variabel	Probe in 50 mM Phosphat pH 7.4, 500 mM NaCl, 6 M Harnstoff	1-3	Proteinbindung
5	50 mM Phosphat pH 7.4, 500 mM NaCl, 6 M Harnstoff	1-5	Elution unspezifisch geb. Proteine
5	50 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerol, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 6 M Harnstoff (A)	1-5	Vorbereitung für Rückfaltung
50 (lin. Gradient 0-84% B)	50 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerol, 2 mM CaCl <sub>2</sub> (B)	1-3	Proteinrückfaltung
50 (lin. Gradient 84-100% B)		1-3	Elution des aktiven Zielproteins
10-30 (lin. Gradient)	50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 500 mM Imidazol	1-5	Elution His-Tag-gebundener Propeptid-Fragmente

### Gly-DPhe-Affinitätschromatographie

Die Gly-DPhe-Chromatographie ist ein effizientes Verfahren zur Isolation aktiver M4-Metalloproteasen, die wie Thermolysin die pH-abhängige Affinität zu dem Dipeptid Gly-DPhe nutzt. Die D-Konfiguration von Phenylalanin verhindert hierbei die Hydrolyse und sorgt für die Bindung des Enzyms an das Trägermaterial. Die Affinität verringert sich mit Anhebung des pH um mehrere Größenordnungen, was die Elution des gebundenen Enzyms erlaubt. <sup>[195]</sup>

Die Herstellung des eingesetzten Säulenmaterials Sepharose-TETA-Gly-DPhe (GDF) wurde in Anlehnung an Walsh *et al.*, 1974, durchgeführt. <sup>[196]</sup> Mit 1 mM HCl-gespülte, bromcyanaktivierte Sepharose wurde zunächst mit 2 M Triethylentetramin bei pH 9.0 für 16 h bei RT auf einem Rollinkubator rotiert. Verbliebene reaktive Gruppen wurden anschließend mit 1 M Ethanolamin abgesättigt (2 h, RT). Abschließend ergab die Inkubation mit N-Chloracetyl-D-phenylalanin in 1 M Phosphat pH 11.0 und 50 °C für 20 h das Endprodukt GDF. Je nach Anwendung und zu isolierender Proteasemenge wurden entweder Tropfsäulen oder selbstgepackte Säulen zwischen 0.5 ml und 2 ml verwendet. Die Äquilibrierung wurde mit 10 mM Acetat pH 5.5, 150 mM NaCl und 5 mM CaCl<sub>2</sub> (GDF A) durchgeführt. Die Aufgabe der Probe erfolgte bei diesem pH, der, wenn nötig, mit 10% Essigsäure (pH 4.5) korrigiert wurde. Nach einem

Waschschritt erfolgte die Stoßelution mit 100 mM HEPES pH 8.5, 150 mM NaCl und 5 mM CaCl<sub>2</sub> (GDF B). Der genaue Ablauf der GDF-Chromatographie ist nachfolgend in Tab. 3.12 dargestellt.

**Tab. 3.12** Ablaufprotokoll der Gly-DPhe-Chromatographie

Auftragsvol. [CV]	Lösung	Flussrate [ml*min <sup>-1</sup> ]	Funktion
10	GDF Puffer A	max. 1	Äquilibration
variabel	Probenaufgabe	0.5	Proteinbindung
4-5	GDF Puffer A	max. 1	Elution nicht-bindender Proteine
10	GDF Puffer B	0.5	→ Elution bindungsaktiver Protease-Moleküle

Die einzelnen Fraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert, entsprechend vereinigt, auf pH 6.0 titriert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.4.2. Ionenaustauschchromatographie (ion exchange, IEX)

Ionenaustauscher stellen durch ihre teils hohe Trennleistung eine wichtige Methode zur Separierung komplexer Proteingemische dar. Man unterscheidet zwischen schwachen und starken Anionen- und Kationenaustauschermaterialien (AEX, CEX). Die Bindung basiert auf ionischen Wechselwirkungen, meist geladenen Aminosäuren an der Proteinoberfläche mit positiv oder negativ geladenen Gruppen des Trägermaterials. In dieser Arbeit wurden sulfoniertes Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CEX) und Fractogel EMD TMAE (AEX) (Merck) sowie DEAE-Sephadex (AEX) (GE Healthcare) verwendet, womit jeweils im 3-ml- und 28-ml-Säulen gepackt wurden. Die Flussrate betrug in allen Anwendungen 2 ml\*min<sup>-1</sup>. Die Durchführung beider Chromatographiearten unterschied sich dabei nur in der Zusammensetzung der Puffer und dem pH (Tab. 3.13). Nach dem salzarmen Beladen der äquilibrierten Säule erfolgte nach dem Durchlauf eine Stoßelution der gebundenen Proteine oder ein linearer Gradient von 0-1 M NaCl bzw. 0-0.6 M KCl über mindestens 10 Säulenvolumina.

Die einzelnen Fraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert, entsprechend vereinigt, auf pH 7.0 titriert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

**Tab. 3.13** IEX-Puffer

Zielpotein	IEX Puffer A	IEX Puffer B
rBacillolysin(-E138A)	50 mM Tris (50 mM HEPES) pH 8.0, 5 mM CaCl <sub>2</sub>	50 mM Tris (50 mM HEPES) pH 8.0, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 M NaCl
rAureolysin	20 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl <sub>2</sub>	20 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 M NaCl
(r)DAIP	50 mM Na-Acetate pH 4.0	50 mM Na-Acetate pH 4.0, 1 M NaCl
Sm-TG	50 mM Tris-Acetate pH 6.0	50 mM Tris-Acetate pH 6.0, 1 M NaCl

### 3.4.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) nutzt die unpolaren Wechselwirkungen eines Proteins mit der stationären Phase. Die Proteine werden hierbei aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität in einem Hochsalzpuffer aufgetrennt. Das Salz entzieht ihnen dabei partiell die

Hydrathülle und legt somit vermehrt unpolare Gruppen frei. Über diese interagiert das Protein dann mit den hydrophoben Liganden des Säulenmaterials. Dabei gilt, je höher die Hydrophobizität des Proteins, desto geringer muss die zur Bindung erforderliche Salzkonzentration sein. Bei den verwendeten HiTrap Phenyl HP bzw. Phenyl-Sepharose der Firma GE Healthcare waren Phenyl-Gruppen an eine stark vernetzte Agarose gekoppelt. Die Proteinbindung erfolgte bei höchster Salzkonzentration. Durch lineare Reduktion der Salzkonzentration von 1.5-0 M Ammoniumsulfat oder 2.5-0.05 M Natriumchlorid wurden die Proteine getrennt (Tab. 3.14).

**Tab. 3.14 HIC-Puffer**

Zielprotein	HIC Puffer A	HIC Puffer B
Thermolysin	50 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 2.5 M NaCl	50 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl <sub>2</sub>
rPseudolysin-E141A	50 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 3 M NaCl	50 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl <sub>2</sub>
DAIP	50 mM Tris pH 7.5, 1.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 mM Tris pH 7.5

#### 3.4.4. Größenausschlusschromatographie (GPC)

Die Größenausschlusschromatographie oder auch Gelpermeationschromatographie (GPC) wird meist zur abschließenden präparativen Reinigung konzentrierter Proteinlösungen eingesetzt. Dabei werden die gelösten Moleküle über ihren hydrodynamischen Radius aufgetrennt. <sup>[197]</sup> Die stationäre Phase besteht meist aus einer porösen Matrix, die größere Moleküle die Säule schneller passieren lässt als kleine. Abhängig von der Porengröße besitzen diese eine längere Verweildauer auf der Säule bzw. Poren und eluieren somit später. Vor jeder Chromatographie wurde die entsprechende Säule mit min. 2 CV des Laufpuffers äquilibriert.

Um letzte Kontaminationen zu entfernen und das Protein in einen geeigneten Lagerpuffer zu überführen wurde als finaler Schritt bei allen Proteinreinigungen eine präparative GPC über eine HiLoad Superdex 75 pg 16/600 (120 ml, S75) der Firma GE Healthcare an einer ÄKTaprime Plus durchgeführt. Die Probenaufgabe und anschließende Elution erfolgte hierbei über 1-ml- bzw. 2-ml-Injektionsschleifen mit einer Flussrate von 1 ml\*min<sup>-1</sup>. Die Detektion erfolgte über UV/Vis-Absorption bei 280 nm. Zusätzlich wurde abhängig von der applizierten Probe die Säule auf 6 °C gekühlt, um die Autolyse von Proteasen zu reduzieren. Fraktionen mit der erforderlichen Reinheit wurden vereinigt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die GPC wurde im Rahmen dieser Arbeit auch zur Proteinanalytik für die Untersuchung der Komplexbildung von DAIP und seiner Zielproteasen mit einer Superdex 200 increase 3.2/300-Säule (2.4 ml) an einer LaChrom L-7200 (Hitachi) oder einer Agilent 1200 HPLC (Agilent) durchgeführt. Die Probenaufgabe und Elution erfolgte über eine 10-µl-Injektionsschleife mit einer Flussrate von 0.035-0.075 ml\*min<sup>-1</sup>, die Detektion bei 214 nm oder 220/280 nm.

---

### **3.4.5. Konzentrierung von Proteinlösungen**

Proteinproben wurden zur Reduktion des Volumens in Ultrafiltrationseinheiten der Firma Sartorius (Vivaspin) oder Merck (Amicon) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa durch Zentrifugation konzentriert. Die Durchführung erfolgte nach vorheriger Äquilibrierung der Membran gemäß Herstellerangaben bei 4,000 *g* und 4 °C in einer Festwinkelrotorzentrifuge.

### **3.4.6. Proteinfällung**

Lösungsmittel wie Ethanol oder Aceton setzen aufgrund ihrer niedrigen Dielektrizitätskonstante die Wasserlöslichkeit von Polymeren herab und erlauben eine fraktionierende Fällung von Proteinen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ethanol-Fällung dafür eingesetzt, *Sm*-TG und DAIP aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* durch Abtrennung anderer extrazellulärer Proteine vorzureinigen und zu konzentrieren. Die DAIP-Fällung erfolgte nach Sarafeddinov *et al.*, 2009, zwischen 50%-80% (v/v) Ethanol. <sup>[62]</sup> Die Transglutaminase von *S. mobaraensis* wurde zwischen 30% und 50% (v/v) Ethanol gefällt. Um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden, wurden alle Präzipitationen auf Eis bei 4 °C unter mechanischem Rühren und langsamen Zutropfen von -20 °C Ethanol über einen Tropftrichter durchgeführt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 13,000 *g* und 4 °C wurden die Präzipitate in 50 mM Natriumacetat pH 4.0 oder 50 mM Tris-Acetat pH 6.0 resuspendiert, sterilfiltriert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert.

Zur quantitativen Fällung von neutralen Proteasen wurde die Aceton-Fällung angewendet. Die zu fällende Probe wurde bei 4 °C mit dem 2.5fachen Volumen an -20 °C Aceton versetzt und für 30 min bis 16 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 13,000 *g* für 10 min wurde der Überstand abgenommen, das Präzipitat 15 min an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Puffer-Volumen wiederaufgenommen.

### **3.4.7. Lyophilisation**

Die Lyophilisation (Gefriertrocknung) ist eine schonende Methode zur Konzentrierung bzw. Konservierung gefrorener Proteinproben durch Sublimation von Wasser bei starkem Unterdruck. Sie wurde genutzt, um Proben zu konzentrieren und für längere Lagerung zu stabilisieren. Die Proben wurden hierfür in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einer ALPHA 1-4 LSC (Christ) bis zur vollständigen Trocknung lyophilisiert. Die Kondensatortemperatur betrug -63 °C bei einer Stellflächentemperatur von -14 °C und 0.016 mbar.

### **3.4.8. Dialyse**

Zur Umpufferung bzw. Entsalzung von Proteinlösungen wurde das Verfahren der Dialyse angewandt. Bei dieser Methode findet der Austausch niedermolekularer Substanzen über eine semipermeable

---

Membran statt, welche eine definierte Molekulargewichtsausschlussgrenze (MWCO) besitzt. Die Proteinproben wurden dabei in einem Dialyseschlauch unter mehrmaligem Puffer-Wechsel gegen jeweils min. 1 L Flüssigkeit bei 4 °C dialysiert. Zum Einsatz kamen hierbei Dialyseschläuche der Firma Serva mit einer MWCO von 10 kDa nach Präparation gemäß Herstellerangaben.

#### **3.4.9. Enzymatische Alkylierung von *Sm*-TG**

Da die mikrobielle Transglutaminase *Sm*-TG selbst ein gutes Q-Substrat ist, war es notwendig, für die durchgeführten kinetischen Markierungsexperimente die Acyl-Donor-Eigenschaften des Enzyms zu reduzieren. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch die enzymvermittelte Konjugation primärer Alkylamine an alle reaktiven Glutamin-Bindestellen realisiert. Die Alkylierung wurde mit 500  $\mu$ M eines Alkylamins (Methylamin, Ethylamin, Ethanolamin), 1 mM N-Lauroylsarcosin (LS) und 10  $\mu$ M *Sm*-TG in 50 mM HEPES pH 8.0 bei 37 °C für 17 h durchgeführt. Überschüssiges Reagenz wurde abschließend durch mehrfache Dialyse gegen min. 1 l 50 mM HEPES pH 8.0 entfernt.

#### **3.4.10. Reduktion von Disulfidbrücken**

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen DAIP und der bakteriellen Elastase Pseudolysin von *P. aeruginosa* war es unter anderem nötig die stabilisierenden Cystinbrücken des Enzyms irreversibel zu öffnen. Die präparative Reduktion erfolgte mit 34  $\mu$ M rPseudolysin-E141A und 2.5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in 50 mM HEPES pH 8.0 bei 37 °C für 1 h. Die reduzierten Cysteine wurden anschließend mit 20 mM Iodacetamid (IAA) über 30 min und 37 °C unter Lichtausschluss alkyliert. Überschüssiges Reagenz wurde abschließend über eine mit 50 mM HEPES pH 8.0, 2 mM CaCl<sub>2</sub> äquilibrierte *PD midiTrap G-25*-Säule der Firma GE Healthcare abgetrennt.

### **3.5. Proteinanalytische Methoden**

#### **3.5.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

##### **BCA:**

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA) beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu<sup>2+</sup> Ionen im alkalischen Milieu durch Peptidbindungen des Proteinrückgrats sowie den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert werden. Diese einwertigen Metallionen bilden mit BCA einen Chelat-Komplex, welcher bei 562 nm spektroskopisch detektiert werden kann und dessen Intensität dabei mit der Proteinkonzentration korreliert. <sup>[198]</sup>

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) in Mikrotiterplatten eingesetzt. Die Kalibriergerade wurde mit einem Rinderserumalbumin (BSA)-Standard gebildet (62.5, 125, 250, 500 und 1000  $\mu$ g\*ml<sup>-1</sup>). Jede Kavität wurde nach Herstellerangaben mit 200  $\mu$ l BCA und 25  $\mu$ l Probe befüllt und für 30 min bei 37 °C (400 rpm) inkubiert. Direkt im Anschluss

---

erfolgte die Detektion der Absorption bei 560 nm (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific). Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss über lineare Regression der Kalibriergerade ermittelt.

#### **Absorptionsbestimmung bei 280 nm:**

Alternativ wurde zur Quantifizierung von gereinigten Proteinproben mit bekannter Aminosäuresequenz deren Eigenabsorption bei 280 nm bestimmt. Durch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan absorbieren Proteine Licht bei 280 nm und besitzen dort einen spezifischen Extinktionskoeffizienten, worüber sich unter Zuhilfenahme des Lambert-Beer'schen Gesetzes eine Proteinkonzentration ermitteln lässt.

$$A_{280} = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 1})$$

$I_0$  = Intensität des eingestrahlten Lichtes

$I$  = Intensität des die Probe verlassenden Lichtstrahls

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ]

$c$  = Konzentration der Probe

$d$  = Schichtdicke der Probe

Die molaren Extinktionskoeffizienten der zu bestimmenden Proteine wurden über ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte an einem UV/Vis-Spektralphotometer (BioSpectrometer basic, Eppendorf) mit einer  $\mu$ Cuvette G1.0 und entsprechendem Puffer als Referenz.

#### **Konzentrationsbestimmung über SDS-PAGE:**

Da Proteasen generell zur Autolyse neigen, sind die über BCA bzw.  $A_{280}$  ermittelten Konzentrationen nicht repräsentativ für die tatsächliche Proteinkonzentration des aktiven Enzyms. Um diesem Umstand gerecht zu werden, wurde ein Verfahren zur Quantifizierung von Proteasen über SDS-PAGE in Verbindung mit dem Odyssey Sa Infrared Imaging System der Firma LI-COR etabliert. Hierfür wurde zunächst rBacillolysine-E138A gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert, anschließend lyophilisiert und nach Einwaage wieder in Puffer aufgenommen. Unterschiedliche E138A-Mengen auf einem SDS-PA-Gel korrelierten nach einer Coomassie-Färbung mit der Fluoreszenzintensität und erlaubten, wie Albumin bei der BCA-Methode, die Erstellung einer Kalibriergeraden.



Auftrag [μg]	Auftragsvol. [μl]	Konzentration [mg*ml <sup>-1</sup> ]	integrierte Fluoreszenzintensität [I.I. K counts]
8	10	1.000	37.13
4	10	0.500	19.37
2	10	0.250	9.45
1	10	0.125	4.63

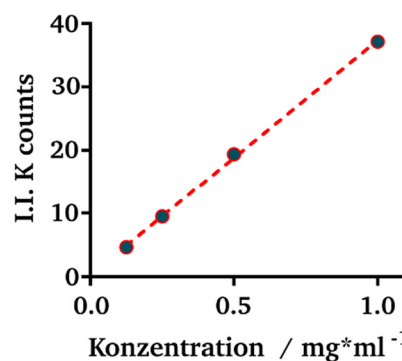


Abb. 3.4 Kalibriergerade mit rBacillolysin-E138A zur effektiven Konzentrationsbestimmung unbekannter M4-Protease-Lösungen über SDS-PAGE.

### 3.5.2. Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Zum Nachweis struktureller Veränderungen zwischen freier und von DAIP gebundener Protease wurden die entsprechenden Proben mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie untersucht. Zur Entfernung interferierender Substanzen wurden die Proteinlösungen über PD midiTrap G-25-Säulen der Firma GE Healthcare in CD-Puffer überführt (5 mM MOPS pH 6.5, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) und auf eine Konzentration von 6 μM eingestellt. Die Spektren wurden in einer Quartzküvette mit 0.1 cm Schichtdicke am Jasco j-815 CD Spectropolarimeter im Wellenlängenbereich von 195 nm bis 260 nm aufgenommen. Jede Probe wurde mehrfach gemessen und die gemittelte Elliptizität θ in mdeg wurde gegen die Wellenlänge aufgetragen.

### 3.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse proteinenthaltender Proben erfolgte unter anderem durch denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), in der Proteine nach ihrem apparenten Molekulargewicht getrennt werden. <sup>[199]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Anlehnung an Laemmli *et al.* (1970) ausschließlich SDS-PA-Gele mit 12.5% (w/v) Acrylamid verwendet (Tab. 3.15). <sup>[200]</sup> Zur Unterbindung der Autolyse proteaseenthaltender Proben wurde ein reduzierender 5fach SDS-Auftragspuffer (SDS-AP) mit 50 mM EDTA und 25 mM 1,10-Phenanthrolin eingesetzt, welcher vor Probenzugabe auf 95 °C vortemperiert wurde (Tab. 3.16). Die Denaturierungszeit betrug dabei 1 min. Bei Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen >4 mM im Probenpuffer wurden zusätzlich zwei Teile 50 mM EDTA supplementiert. Zur Größenbestimmung wurden entsprechend 5 μl einer Molekulargewichtsmarkermischung auf dem Gel mitgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 200V für etwa 35 min in einer *Mini Protean III*-Elektrophoresekammer (Bio-Rad).

**Tab. 3.15 Pipettierschema zur Herstellung von zwei 12.5% SDS-PA-Gelen**

Komponente	Trenngel 12.5%	Sammelgel 5%
Acrylamidlösung (29% (w/v) Acrylamid; 1% (w/v) Bisacrylamid)	5 ml	660 µl
1 M Tris-HCl pH 8.9 (Trenngelpuffer)	4.5 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6.8 (Sammelgelpuffer)	-	500 µl
MilliQ-Wasser	2.2 ml	2.75 ml
20% SDS-Lösung	60 µl	20 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl	5 µl
12% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	100 µl	50 µl

**Tab. 3.16 SDS-Auftragspuffer und Molekulargewichtsmarkermischungen**

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
5x red. Auftragspuffer m. <u>EDTA/Phen</u>	310 mM Tris pH 6.8, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 0.25 mg*ml <sup>-1</sup> Bromphenolblau, 50 mM Dithiotreitol, 50 mM EDTA, 25 mM 1,10-Phenanthrolin
PageRuler unstained Protein Ladder (CBB) #26614	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PageRuler prestained Protein Ladder (WB) #26616	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Chameleon Duo, prestained (WB) #928-60000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

### 3.5.4. Coomassie-Brillantblau-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Visualisierung und Fixierung der Proteinbanden auf SDS-PA-Gelen erfolgte durch Coomassie-Brillantblau-Färbung (CBB-Färbung). <sup>[201]</sup> Hierfür wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung (3.1.8) versetzt, kurz in der Mikrowelle erhitzt und dann unter Schütteln 10 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in zwei Schritten durch zunächst 5 min Schütteln mit erhitzter Entfärbelösung und abschließender Entfärbung und Lagerung in 10% (v/v) Essigsäure. Die Dokumentation und Auswertung der Gele erfolgte am Fluoreszenzbettscanner Odyssey Sa der Firma LI-COR durch Anregung der Gele bei 685 nm und Detektion des emittierten Lichts bei 700 nm.

### 3.5.5. Western Blot

Western Blot (WB) bezeichnet die Übertragung (engl. *blotting*) von Proteinen auf eine Trägermembran in einem senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feld und dient in den meisten Fällen zum immunchemischen Nachweis von Proteinen bzw. Proteinmodifikationen. Der Transfer von Proteinen aus SDS-PA-Gelen erfolgte auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran *Immobilon-P* (Merck). Zur Größenabschätzung der Proteine wurden gefärbte Molekulargewichtsmarkermischungen mitgeführt. Für den Proteintransfer wurden das Gel, die Membran sowie zwei Filterpapiere vor Beginn für 10 min in Transferpuffer äquilibriert (3.1.8). Die Membran musste dafür zunächst in Methanol aktiviert werden. Das *Blotting* wurde bei 12V für etwa 60 min mit dem *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad) im *semy-dry*-Verfahren durchgeführt (Abb. 3.5). Nach fünf minütigem Waschen in TBS-T wurde die Membran anschließend ü.N. bei 4 °C mit *Odyssey Blocking Buffer* (LI-COR) inkubiert, um freie Bindestellen zu blockieren.

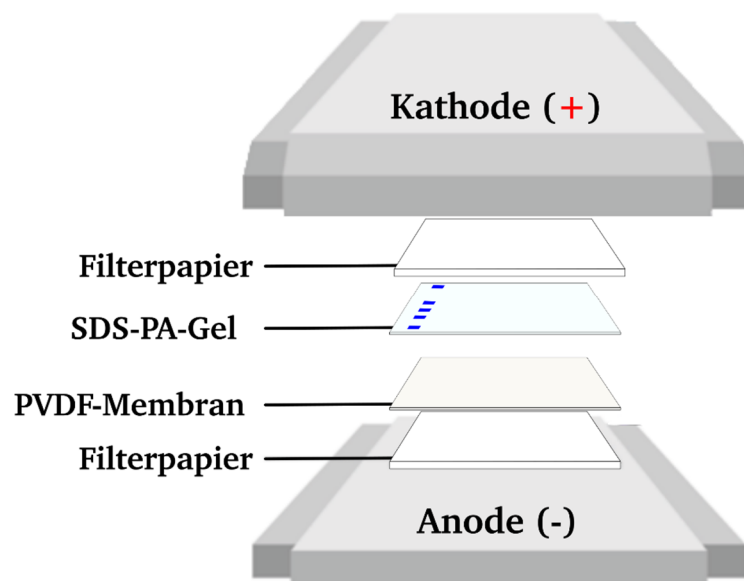


Abb. 3.5 Schematischer Aufbau des Proteintransfers über Western Blot

### immunchemische Färbung

Der spezifische Nachweis immobilisierter Proteine erfolgte über immunchemische Färbung durch den Einsatz spezifischer Erstantikörper aus Kaninchen und entsprechender Zweitantikörper-Fluorophor-Konjugate (*IRDye® 680LT bzw. 800CW Goat anti-Rabbit IgG, LI-COR*). Für die Charakterisierung und Quantifizierung der durch *Sm*-TG vermittelten Markierung von Substratproteinen mit Biotinylcadaverin wurde ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidinderivat verwendet (*IRDye® 800CW Streptavidin, LI-COR*) (Tab. 3.17).

Tab. 3.17 Übersicht der Reagenzien zum immunchemischen Nachweis von Proteinen/-modifikationen

Funktion	Reagenz	Hersteller
Erstantikörper	Rabbit anti-DAIP polyclonal IgG	Eurogentec, Seraing (B)
	Rabbit anti- <i>Sm</i> -TG polyclonal IgG	Eurogentec, Seraing (B)
	Rabbit anti-Bacillolysin polyclonal IgG, #AP21384AF-N	Acris Antibodies, Herford
	Rabbit anti-His polyclonal IgG, #3742.1	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Zweitantikörper	IRDye® 680LT Goat anti-Rabbit IgG, #925-32211	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
	IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG, #925-68021	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Biotinnachweis	IRDye® 800CW Streptavidin, #925-32230	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Nach der Inkubation mit *Odyssey Blocking Buffer* wurde die Membran 2x5 min mit PBST gewaschen. Im Anschluss erfolgte je nach Fragestellung die Inkubation mit (i) dem entsprechenden Erstantikörper (1:5,000-1:20,000 in PBST) oder (ii) dem fluoreszenzmarkierten Streptavidinderivat für 1 h unter Schütteln bei RT. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS-T erfolgte bei (i) die Inkubation mit dem Zweitantikörper-Konjugat ebenfalls für 1 h. Vor der Detektion im Fluoreszenzbettscanner Odyssey Sa (LI-COR) wurde die Membran 4\*5 min mit PBST/PBS gewaschen, um ungebundene Fluorophorderivate zu entfernen. Der spezifische Nachweis erfolgte abschließend durch Detektion des emittierten Lichts bei 700 nm ( $\lambda_{\text{ex.}}$  685 nm) bzw. 800 nm ( $\lambda_{\text{ex.}}$  785 nm). Eine Übersicht des Färbeprotokolls ist Tab. 3.18 zu entnehmen.

**Tab. 3.18 Ablaufprotokoll einer immunchemischen Färbung nach Western Blot Proteintransfer**

Schritt	Reagenz, Zeit	
Waschen	2 x 5 min mit PBST	
Blockieren	ü.N., 4 °C mit <i>Odyssey Blocking Buffer</i>	
Waschen	2 x 5 min mit PBST	
Erstantikörper/ <i>Streptavidin-Konjugat</i>	1 h in PBST	1 h in PBST
Waschen	4 x 5 min mit PBST	4 x 5 min mit PBST
Zweitantikörper-Konjugat	1 h in PBST	-
Waschen	4 x 5 min mit PBST	-
Waschen	2 x 5 min mit PBS	2 x 5 min mit PBS
Detektion	Emissionsbestimmung bei 700 nm ( $\lambda_{ex}$ 685 nm) bzw. 800 nm ( $\lambda_{ex}$ 785 nm)	

### 3.5.6. Zymographie

Die Zymogramm-Analytik erlaubt es, die enzymatische Aktivität einiger Proteasen nach einer Auftrennung über SDS-PAGE nachzuweisen. <sup>[202]</sup> Hierfür wird während der Gelherstellung ein geeignetes Substrat wie Casein in das PA-Trenngel polymerisiert, welches bei Anwesenheit einer Protease hydrolysiert wird. Zum Schutz der Proteasen vor irreversiblen Schäden wurde die Elektrophorese bei 125V und 4 °C über 4 h durchgeführt. Durch Auswaschen des im Gel enthaltenen SDS und Renaturierung der Enzyme wurde im Anschluss das Substrat durch Inkubation bei 37 °C für 16-48 h unter mehrmaligem Pufferwechsel abgebaut. Während nach einer CBB-Färbung der Hintergrund durch das enthaltene Casein gefärbt bleibt, erscheinen an Stellen proteolytischer Aktivität ungefärbte Banden. Die Methode wurde unter anderem nach Lantz und Ciborowski, 1994, durchgeführt. Die Materialien sowie eine Übersicht der Durchführung sind in Tab. 3.19 und

Tab. 3.20 dargestellt. <sup>[203-206]</sup>

**Tab. 3.19 Materialien für Zymogramm-Analytik**

Bestandteil	Zusammensetzung
SDS-PA-Casein-Gel	wie in 3.5.3., im Trenngel 0.3% <i>bovines</i> Casein (Merck, Calbiochem, #218680)
Renaturierungspuffer	25 mM Tris pH 8.3, 100 mM Glycin, 2.5% (v/v) Triton X-100
Proteolysepuffer	25 mM Tris pH 7.4, 100 mM Glycin, 50 mM NaCl, 20 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub>

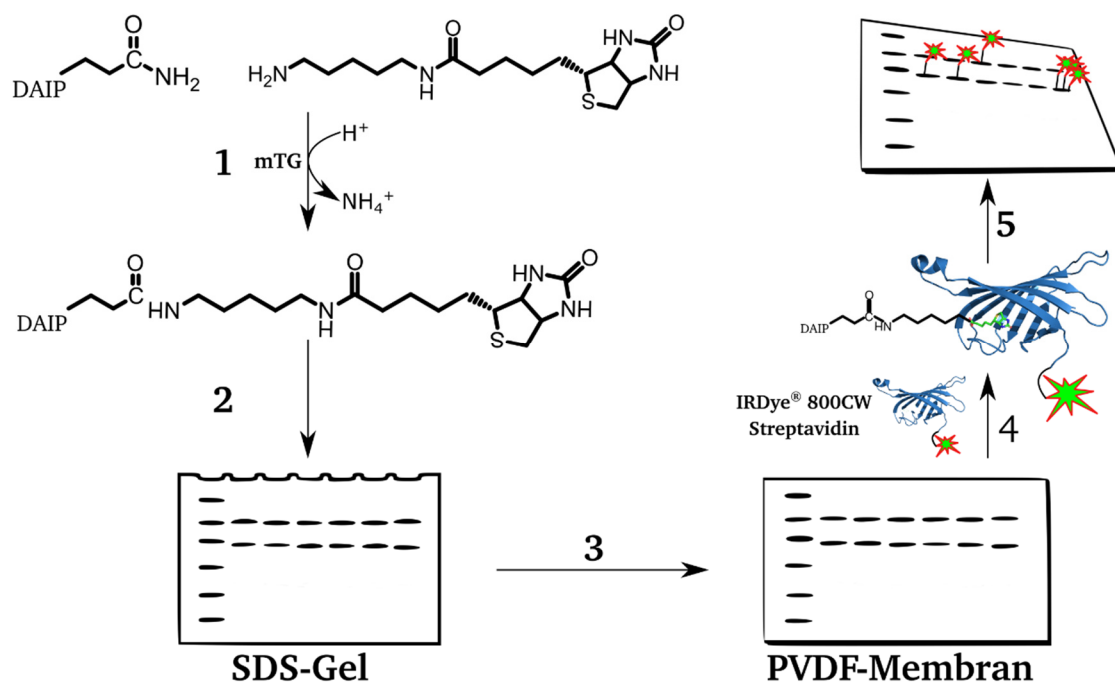
**Tab. 3.20 Durchführung der Zymogramm-Analytik**

Zymogramm-Analytik
Elektrophorese für 4 h bei 125V, 4 °C auf Eis
1 min Waschen des Gels mit ddH <sub>2</sub> O
3x 1 h in Renaturierungspuffer bei RT unter Schütteln inkubieren
16 h in Proteolysepuffer bei 37 °C unter Schütteln inkubieren, 3x Pufferwechsel
3x 10 min in ddH <sub>2</sub> O waschen
abschließende CBB-Färbung (0)

### 3.5.7. Kinetische Analyse von *Sm*-TG vermittelter Proteinmodifikation

Zur Untersuchung der reaktiven Glutaminbindestellen von DAIP hinsichtlich ihrer Eigenschaften als *Sm*-TG-Substrat wurde Monobiotinylcadaverin (MBC) als Acyl-Akzeptor eingesetzt. Für die Charakterisierung wurden neben dem inaktivierenden Wildtyp-Protein auch Varianten untersucht, bei

denen jeweils alle bis auf ein Glutamin durch Asparagin ausgetauscht wurden. Durch kovalente Verknüpfung konnten so in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge und Reaktionszeit kinetische Eigenschaften der Bindestellen ermittelt werden. Die relative Quantifizierung der Markierung erfolgte durch die hochaffine Bindung eines Streptavidin-Fluorophor-Konjugats an Biotin nach dem Proteintransfer über Western Blot. Die enzymatische Markierung von DAIP wurde in Anlehnung an Schmidt *et al.*, 2008, mit kleinen Abweichungen durchgeführt. <sup>[130]</sup> DAIP und seine Varianten (8  $\mu$ M) und 0.2 mM MBC in 100 mM HEPES pH 8.0, wurden mit *Sm*-TG in einem Verhältnis von 1:16-1:50 bei 37 °C bis zu 16 h inkubiert. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne MBC bzw. *Sm*-TG mitgeführt. Die Reaktion wurde durch 10-minütige Denaturierung in SDS-Auftragspuffer bei 95 °C beendet, die Proben anschließend über SDS-PAGE getrennt und ggf. mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Bestimmung des Biotinylierungsgrads erfolgte über immunchemische Färbung nach Abschnitt 3.5.5 durch Einsatz des Streptavidin-Konjugats *IRDye® 800CW Streptavidin* und abschließender Analyse am Odyssey SA Infrared Imaging System der Firma LI-COR (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6** Schematische Darstellung des Nachweises und der Charakterisierung reaktiver Glutaminbindestellen nach Biotinylierung eines Proteins mit *Sm*-TG. 1, enzymatische Biotinylierung; 2, Auftrennung über SDS-PAGE; 3, Proteintransfer über Western Blot; 4, Inkubation mit einem Streptavidin-Fluorophor-Konjugat; 5, fluorimetrische Auswertung

Zur Minimierung *blotting*-bedingter Abweichungen wurde jeweils vergleichend auf die Intensität des Molekulargewichtsmarkers normiert. Für die Auswertung wurde die integrierte Emissionsintensität gleichgroßer Flächen der Proteinbanden bei 800 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  785 nm) erfasst.

### 3.5.8. Hydroxamsäure-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität von *Sm*-TG

Zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität von *Sm*-TG hat sich der Hydroxamsäure-Assay (HA) nach Grossowicz *et al.* etabliert, der hier mit kleinen Abweichungen nach Schmidt, 2008, verwendet

wurde. [133, 207] Grundlage für den Versuchsaufbau ist die Ausbildung einer Hydroxamsäure durch enzymatische Konjugation von Hydroxylamin mit dem synthetischen Substrat Cbz-Glutaminylglycin (ZQG). Diese Säure bildet mit  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen einen chromophoren Komplex, welcher photometrisch durch Absorptionsbestimmung bei 525 nm nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

-Lösung für 10 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Stoppreagenz abgebrochen (Tab. 3.21). Nach 5 min Zentrifugation bei 13,000  $g$  zur Abtrennung präzipitierter Proteine wurde direkt die Absorption bei 525 nm photometrisch bestimmt (Tab. 3.22).

**Tab. 3.21 Reagenzien zur Durchführung des Hydroxamsäure-Assays**

Reagenz	Zusammensetzung
HA-Puffer	200 mM Tris-Acetat pH 6.0
Substrat-Lösung	30 mM ZQG in 200 mM Tris-Acetat pH 6.0, 100 mM Hydroxylamin
Stoppreagenz	12% (v/v) HCl, 5% (w/v) $\text{FeCl}_3$ in 0.1 M HCl, 12% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) in 1:1:1-Verhältnis

**Tab. 3.22 Pipettierschema zur Durchführung des Hydroxamsäure-Assays**

	Blindwert	Analysenansatz
Vortemperieren	500 $\mu\text{l}$ Substrat-Lösung	
Reaktionsstart	50 $\mu\text{l}$ HA-Puffer	50 $\mu\text{l}$ Sm-TG-Probe
Inkubation	10 min, 37 °C	
Reaktionsabbruch	500 $\mu\text{l}$ Stoppreagenz	
Zentrifugation	13,000 $g$ , 5 min	
Absorptionsmessung	Bestimmung der Extinktion bei 525 nm	

Die Transglutaminase-Aktivität ist definiert als die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Hydroxamsäure pro min (1 U).

Die Volumenaktivität des Enzyms berechnet sich daher über:

$$\text{Volumenaktivität } [U * \text{ml}^{-1}] = \frac{\Delta E * V}{\epsilon * d * v * t} = \Delta E * 4.47 [\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{ml}^{-1}] \quad (\text{Gl. 2})$$

- mit  $\Delta E$  Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Blindwert  
 $V$  Gesamtvolumen (1.05 ml)  
 $\epsilon$  Extinktionskoeffizient von  $\text{Fe(III)}$ -Glutamylhydroxamat ( $0.470 \text{ ml} * \text{cm}^{-1} * \mu\text{mol}^{-1}$ )  
 $v$  Volumen der Probe (0.050 ml)  
 $d$  Schichtdicke der Probe (1 cm)  
 $t$  Reaktionszeit (10 min)

### 3.5.9. Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit Azocasein

Der Azocasein-Assay basiert auf der unspezifischen Hydrolyse von Casein, welches chemisch mit einem Azofarbstoff gekoppelt wurde. Durch Abbau des Caseins werden farbige Peptide freigesetzt, welche nach Abbruch der Reaktion mit 10%iger TCA im Gegensatz zum ungespaltenen Substrat und anderer Proteine im Überstand verbleiben. Die Detektion des Farbstoffs erfolgt abschließend photometrisch durch Bestimmung der  $A_{420}$ . Als Blindwert dienten Reaktionsansätze ohne Protease. Die Reaktion erfolgte wie in Tab. 3.23 beschrieben für 30 min bei 37 °C (Tab. 3.24). Nach Zentrifugation bei 13,000  $g$  für 5 min wurde direkt die Extinktion des Überstands bei 420 nm bestimmt.



Tab. 3.23 Durchführung des Azocasein-Assays

	Blindwert	Analysenansatz
Vortemperieren	200 $\mu$ l Substrat-Lösung	
Reaktionsstart	200 $\mu$ l Protease-Puffer	200 $\mu$ l Probe
Inkubation	30 min, 37 °C	
Reaktionsabbruch	600 $\mu$ l Stoppreagenz	
Zentrifugation	13,000 g, 5 min	
Absorptionsmessung	Bestimmung der Extinktion bei 420 nm	

Tab. 3.24 Reagenzien zur Durchführung des Azocasein-Assays

Reagenz	Zusammensetzung
Protease-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM CaCl <sub>2</sub>
Substrat-Lösung	1% (w/v) Azocasein, #A2765 (Sigma-Aldrich) in Proteasepuffer
Stoppreagenz	10% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)

### 3.5.10. Aktivitätstest für P1'-Endoproteasen mit Furylacryloyl-Gly-Phe-amid (FaGFa-Assay)

Das Dipeptid-Derivat 3-(2-Furylacryloyl)glycylphenylalanylamid (FaGFa) zählt neben FaGLa zu dem am weitesten verbreiteten Substrat für den photometrischen Nachweis von Endoproteasen mit P1'-Spezifität an hydrophoben und aromatischen Aminosäuren. <sup>[182]</sup> Die N-seitige Spaltung an Phenylalanin geht hierbei mit einer Extinktionsabnahme bei 340 nm einher, welche so kontinuierlich bestimmt und damit im Mikrotiterplatten-Format (MTP) durchgeführt werden kann.

Der Assay erfolgte im MTP-Format durch kontinuierliche Messung der A<sub>340</sub> für 20 min bei 37 °C entsprechend Tab. 3.25.

Tab. 3.25 Durchführung des FaGFa-Assays

	Negativ-Kontrolle	Analysenansatz
Vortemperieren	190 $\mu$ l Protease-Puffer	190 $\mu$ l Probe
Reaktionsstart	10 $\mu$ l 20 mM FaGFa in DMSO	
Inkubation	20 min, 37 °C	
kontinuierliche Absorptionsmessung	Bestimmung der Extinktion bei 340 nm	

Die mit fortschreitender Reaktionsdauer abnehmende Absorption wurde im linearen Bereich als Maß für die Restaktivität herangezogen und auf die mitgeführte Positivkontrolle normiert.

### 3.5.11. Aktivitätstest für P1'-Endoproteasen mit Dabcyl-Ser-Phe-EDANS (DabSFans-Assay)

Zum Nachweis von Endoproteasen mit P1'-Spezifität wurde des Weiteren das gequenchte Dipeptid Dabcyl-Ser-Phe-EDANS nach Weimer *et al.*, 2006, synthetisiert und mit leichten Modifikationen in einem fluoreszenzbasierten Assay (DabSFans-Assay) eingesetzt. <sup>[208]</sup> Durch spezifische Spaltung der einzigen Peptidbindung zwischen Serin und Phenylalanin wird die Fluoreszenzlöschung über Försterresonanzenergietransfer von Ethylendiaminonaphthalinsulfonsäure (EDANS) durch den Azofarbstoff Dimethylaminoazobenzencarboxyl-(Dabcyl) aufgehoben. Die daraus resultierende

Fluoreszenzzunahme und deren Anstieg korreliert dabei mit der proteolytischen Aktivität des eingesetzten Enzyms. Das Substrat eignet sich zudem aufgrund seiner Spezifität auch zum Nachweis von P1'-Proteasen in Proteingemischen wie dem Lysat von *E. coli*, da es von keiner intrinsischen Protease der Wirtsbakterien gespalten wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das Substrat nach Weimer *et al.*, 2006, synthetisiert und der *DabSFans*-Assay für einen größeren Durchsatz in Mikrotiterplatten optimiert. Die Durchführung erfolgte durch Inkubation der Proteasen-Probe mit 39.2 µM *DabSFans* bei 30 °C und kontinuierlicher Emissionsbestimmung bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  340 nm) in einem Reaktionsvolumen von 180 µl (Tab. 3.26).

**Tab. 3.26 Durchführung des *DabSFans*-Assays**

	Blindwert	Analysenansatz
Probenvorlage	170 µl Protease-Puffer	170 µl Probe
Reaktionsstart	10 µl 705.6 µM <i>DabSFans</i> in DMSO	
Inkubation	bis zu 30 min, 37 °C	
kontinuierliche Fluoreszenzmessung	Bestimmung der Emission bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ 340 nm)	

Die mit fortschreitender Reaktionsdauer zunehmende Fluoreszenzintensität wurde im linearen Bereich als Maß für die Restaktivität herangezogen und auf die mitgeführte Positivkontrolle normiert.

### 3.5.12. Fluoreszenzpolarisations (FP)-Assay zur Ermittlung kinetischer Parameter von DAIP

Werden Fluorophore wie Fluorescein mit linear polarisiertem Licht angeregt, so strahlen sie in den meisten Fällen ebenfalls linear polarisiertes Licht aus. Diese Eigenschaft wird als Fluoreszenzpolarisation bezeichnet und ist stark von der Beweglichkeit/Rotationsfreiheit der Fluorophore abhängig. So besitzen freie Fluorophore aufgrund ihrer hohen Mobilität eine relativ niedrige Polarisation (P), welche durch adsorptive bzw. kovalente Bindung an größere Moleküle wie Proteine stark erhöht wird. Dies macht sich vor allem in der Biomedizin und der Wirkstoffforschung bei der Suche nach niedermolekularen Substanzen mit biologischer Aktivität zunutze.<sup>[209]</sup> Ausgedrückt wird die Polarisation durch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in paralleler ( $I_{\parallel}$ ) und perpendikulärer ( $I_{\perp}$ ) Orientierung zum Analyten unter Einbeziehung eines geräteabhängigen Gewichtungsfaktors (G).

$$P = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}} \quad (\text{Gl. 3})$$

- mit P Fluoreszenzpolarisation (mP)
- $I_{\parallel}$  polarisierte Emissionsintensität parallel zur Probe
- $I_{\perp}$  polarisierte Emissionsintensität perpendikulär zur Probe
- G Gewichtungsfaktor

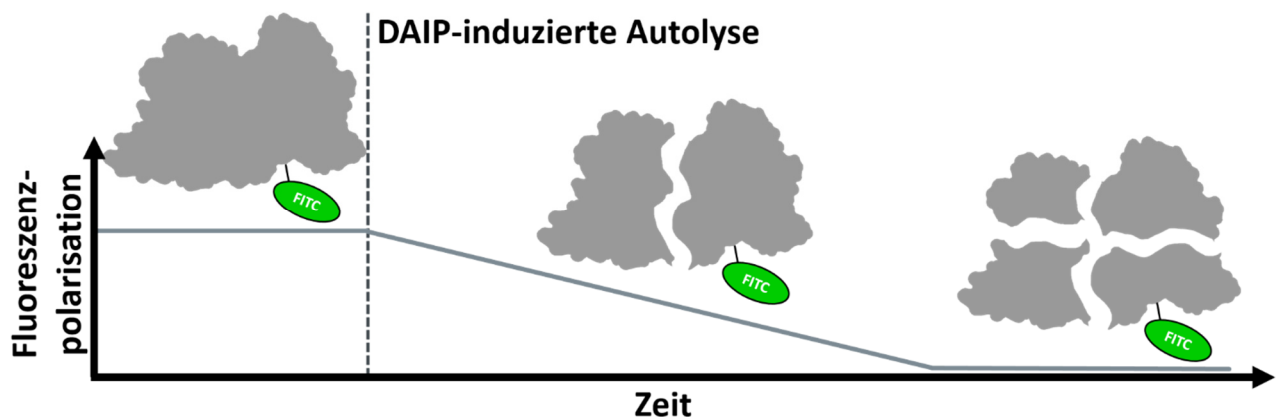


Abb. 3.7 Schematische Darstellung der Fluoreszenzpolarisationsabnahme durch die DAIP-induzierte Hydrolyse von rBacillolysin-E138A-FITC mit Trypsin

Die Fluoreszenzpolarisation wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmung der DAIP-vermittelten rBacillolysin-E138A-Hydrolyse durch Trypsin verwendet. Dazu wurde E138A mit Fluorescein kovalent markiert. Die höhere Beweglichkeit der Fragmente von E138A-FITC resultierte in einer linearen Abnahme der Fluoreszenzpolarisation (Abb. 3.7).

### Vorbereitung (FITC-Kopplung)

Die Kopplung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an rBacillolysin-E138A erfolgte in einem molaren Verhältnis von 20:1 in 50 mM HEPES pH 8,0, 50 mM NaCl und 5 mM  $\text{CaCl}_2$  für 16h bei 4 °C. Die Reaktion wurde anschließend durch Inkubation mit 200 mM Tris pH 8,5 für 1 h bei RT abgebrochen. Überschüssiges Reagenz wurde über mit 50 mM Tris pH 7,5 und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  äquilibrierte PD midiTrap G-25-Säulen der Firma GE Healthcare abgetrennt. Der durchschnittliche Markierungsgrad (*degree of labeling*, DOL) wurde mit ein bis zwei Fluorophoren pro Protease-Molekül bestimmt.

### Durchführung des FP-Assays

Die Durchführung des FP-Assays erfolgte durch Inkubation von 25-7000 nM Bacillolysin-E138A-FITC, 25  $\mu\text{M}$  Trypsin und 10-80 nM DAIP in 50 mM Tris pH 7,5 mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 30 °C. Das Reaktionsvolumen betrug 150  $\mu\text{l}$ . Die Bestimmung der Fluoreszenzpolarisation erfolgte kontinuierlich bis zu 45 min mit linear polarisiertem Licht bei 485 nm und Detektion der Emission in paralleler und perpendicularer Orientierung bei 520 nm.

### Auswertung des FP-Assays

Die erhaltenen Daten ergaben mithilfe des Simulationsprogramms COPASI (COPASI Project) ein Drei-Stufen-Modell, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der DAIP-Katalyse anzeigte. <sup>[210]</sup>

### 3.5.13. Proteaseentfaltungs- und Hydrolyse-Studien mit SYPRO-Orange

SYPRO-Orange gehört zu den Merocyanin-Farbstoffen und findet seine Anwendung hauptsächlich als Alternative zur Silber- oder CBB-Färbung bei der SDS-PA-Gelelektrophorese. Die Fluoreszenz des Farbstoffs steigt hierbei durch Bindung an hydrophobe Bereiche von Proteinen und proteingebundenes SDS an.<sup>[211]</sup> Weitere Anwendung findet SYPRO-Orange beim Einsatz in *Thermal Shift Assays* zur Untersuchung der Temperaturstabilität von Proteinen anhand ihres Schmelzpunktes.<sup>[212]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Farbstoff zunächst eingesetzt, um die DAIP-induzierte Strukturänderung der Ziel-Proteasen zu untersuchen sowie deren Abbau semi-quantitativ zu verfolgen. Weiterhin konnte der Propeptidabbau der nicht-funktionellen Variante E138A durch Trypsin untersucht werden.

Zur Reduktion von Störsignalen durch Adsorption des Farbstoffs an den Wänden der Mikrotiterplatte wurden zunächst die Metalloproteasen (0.5-10  $\mu\text{M}$ ) mit SYPRO-Orange in 50 mM Tris pH 7.5 und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 30 °C für 15 min vorinkubiert. Nach Zugabe von DAIP (2-10  $\mu\text{M}$ ) wurde die Fluoreszenz kontinuierlich bei 580 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  485 nm) und 30 °C für eine Dauer von bis zu 3 h aufgenommen (Tab. 3.27). Zur Verfolgung der Propeptidhydrolyse von *Pro*-Bacillolysin-E138A wurden Mischungen des nicht-funktionellen Proenzym und SYPRO-Orange mit 0.08-8  $\mu\text{M}$  Trypsin bei 30 °C vorbehandelt.

Tab. 3.27 Durchführung des SYPRO Orange-Assays

	Negativ-Kontrolle	Blindwert	Ansatz
Probenvorinkubation 15 min, 30 °C	100 $\mu\text{l}$ Protease w/o DAIP	135 $\mu\text{l}$ Protease-Puffer	100 $\mu\text{l}$ Protease w/o DAIP
Reaktionsstart	15 $\mu\text{l}$ SYPRO-Orange (2x, S5692, Sigma Aldrich)		
Inkubation	35 $\mu\text{l}$ Protease-Puffer	35 $\mu\text{l}$ Protease-Puffer	35 $\mu\text{l}$ DAIP
kontinuierliche Fluoreszenzmessung		bis zu 3 h, 30 °C	
		Bestimmung der Emission bei 580 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ 485 nm)	

### 3.5.14. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC ermöglicht im Gegensatz zu den Festphasenmethoden wie z. B. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) oder SPR-Spektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*) die Untersuchung zweier Interaktionspartner in Lösung und ohne chemische Modifikation.<sup>[213-217]</sup> So kann eine sterische Behinderung der Proteininteraktion mit dem Bindungspartner ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ITC zur Untersuchung der Interaktion von DAIP mit diversen M4-Metalloproteasen genutzt. Das Verfahren basiert auf der Bestimmung von Wärmedifferenzen ( $q$ ) in einem definierten Reaktionsraum, welche durch Zugabe eines Bindungspartners (Ligand) entstehen. Diese können je nach Bindungsart endothermer ( $+\Delta H$ ) oder exothermer ( $-\Delta H$ ) Natur sein.

Durch grafische Auftragung der zum Temperatenausgleich aufgebrauchten Energie gegen die Zeit lassen sich durch Integration der *Peak*-Flächen die Wärmedifferenzen ermitteln, welche in direktem Zusammenhang mit der Enthalpie ( $\Delta H$ ) stehen.<sup>[218]</sup>

$$\Delta q_{i,\text{app}} = \Delta[\text{Ligand}]_{\text{gebunden}} * \text{Volumen Reaktionsraum} * \Delta H_{\text{app}} = N * \Delta H_{\text{app}} \quad (\text{Gl. 4})$$

Der Stöchiometriefaktor (N) und die Assoziationskonstante ( $K_a$ ) lassen sich nach Auftragung der Bindungsenthalpie gegen das molare Verhältnis der Interaktionspartner aus dem Wendepunkt und dessen Steigung ermitteln. Die Bindungsaffinität ( $K_d$ ) ergibt sich über den Kehrwert von  $K_a$  ( $1/K_a$ ).

$$K_a = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} [L * Mol^{-1}] \quad (Gl. 5)$$

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} [Mol * L^{-1}] \quad (Gl. 6)$$

Durch den folgenden Zusammenhang lassen sich weiterhin die Gibbs'sche Enthalpie ( $\Delta G$ ) und die Entropie ( $\Delta S$ ) indirekt bestimmen.

$$\Delta G^\circ = -R * T * \ln K = \Delta H - T * \Delta S [J * Mol^{-1}] \quad (Gl. 7)$$

- mit  $\Delta G$  Gibbs'sche Enthalpie ( $J * Mol^{-1}$ )  
 $R$  universelle Gaskonstante ( $8.31448 J * K^{-1} * Mol^{-1}$ )  
 $T$  Temperatur in Kelvin (K)  
 $K$  Gleichgewichtskonstante (einheitslos)  
 $H$  Enthalpie ( $J * Mol^{-1}$ )  
 $S$  Entropie ( $J * K^{-1} * Mol^{-1}$ )

Die Durchführung erfolgte am *PEAQ ITC*-Kalorimeter der Firma Malvern, wenn nicht anders angegeben, unter den in Tab. 3.28 hinterlegten Bedingungen. Um Störeffekte wie große Verdünnungswärme weitestgehend zu reduzieren, befanden sich die Analyten im selben Puffer.

Tab. 3.28 Bedingungen zur Durchführung der ITC

Bedingungen zur Durchführung der ITC		Bemerkung
Analysesoftware	MicroCal PEAQ-ITC Control Software 1.1.0 (Malvern)	
Temperatur	30 °C	
Referenzenergie- / Antwortrate	5 $\mu cal * s^{-1}$ / hoch	
Referenzzelle	ddH <sub>2</sub> O	
Rührerdrehzahl	750 rpm	
Vorlaufzeit	60 s	
Injektionen	18 Stück à 2 $\mu l$ 0.5 $\mu l * s^{-1}$ im Abstand von 150 s	
Probe in Messzelle	M4-Protease, 10-20 $\mu M$	
Titrant in Spritze	DAIP, 100-200 $\mu M$	
Puffer	50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub>	

### 3.5.15. Schmelzpunktbestimmung über intrinsische Fluoreszenz

Die Bestimmung des Schmelzpunktes von Proteinen erfolgte über die Aufnahme der intrinsischen Fluoreszenz bei 330 nm und 350 nm ( $\lambda_{ex}$  280 nm) mittels *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF) mit schrittweiser Erhöhung der Temperatur.<sup>[219]</sup> Die Emissionsmaxima von Tryptophan- und Tyrosin-Seitenketten sind stark von der Mikroumgebung der Aminosäuren abhängig.<sup>[220]</sup> Die durch Denaturierung veränderte Konformation drückt sich daher durch stärkere Exposition der in der Regel im Proteinkern anzutreffenden Aminosäuren und der damit einhergehenden Verschiebung zu höheren Emissionswellenlängen aus. Das Verhältnis der gemessenen Emissionen beider Wellenlängen wurde

gegen die Temperatur aufgetragen und ermöglichte die Bestimmung des Schmelzpunktes über den Wendepunkt der erhaltenen Kurve.

Die Durchführung der Schmelzpunktbestimmung erfolgte am nanoDSF-Gerät Prometheus NT.48 der Firma Nanotemper Technologies in der Arbeitsgruppe von Prof. Fessner (TU Darmstadt) unter den in Tab. 3.29 angegebenen Bedingungen.

**Tab. 3.29 Bedingungen der Schmelzpunktbestimmung über intrinsische Fluoreszenz**

<b>Bemerkung</b>	
<b>Kapillare</b>	nanoDSF Standard Capillaries (#PR-C002, NanoTemper Technologies)
<b>Kapillarversiegelung</b>	Capillary Sealing Paste (#PR-C001, NanoTemper Technologies)
<b>Temperaturbereich</b>	25 bis 110 °C
<b>Heizrate</b>	1 °C*min <sup>-1</sup>
<b>Probenkonzentration</b>	0.1 bis 0.5 mg*ml <sup>-1</sup>

### 3.5.16. Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. Stefan Schmelz und Dr. Andrea Scrima vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig die Tertiärstruktur von DAIP sowie die Struktur eines Komplexes aus DAIP und dem C-terminalen Fragment von Thermolysin aus *G. stearothermophilus* durch Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse ermittelt. Für die Kristallisation des nativen Proteins wurde nach Sarafeddin *et al.* gereinigtes und lyophilisiertes Wildtyp-DAIP aus *S. mobaraensis* verwendet. <sup>[62]</sup> Der DAIP-Thermolysin-Komplex wurde durch Mischung der zuvor gereinigten Proteine in einem molaren Verhältnis von 1:1 und anschließender Superdex75-Größenausschlusschromatographie vorbereitet und isoliert.

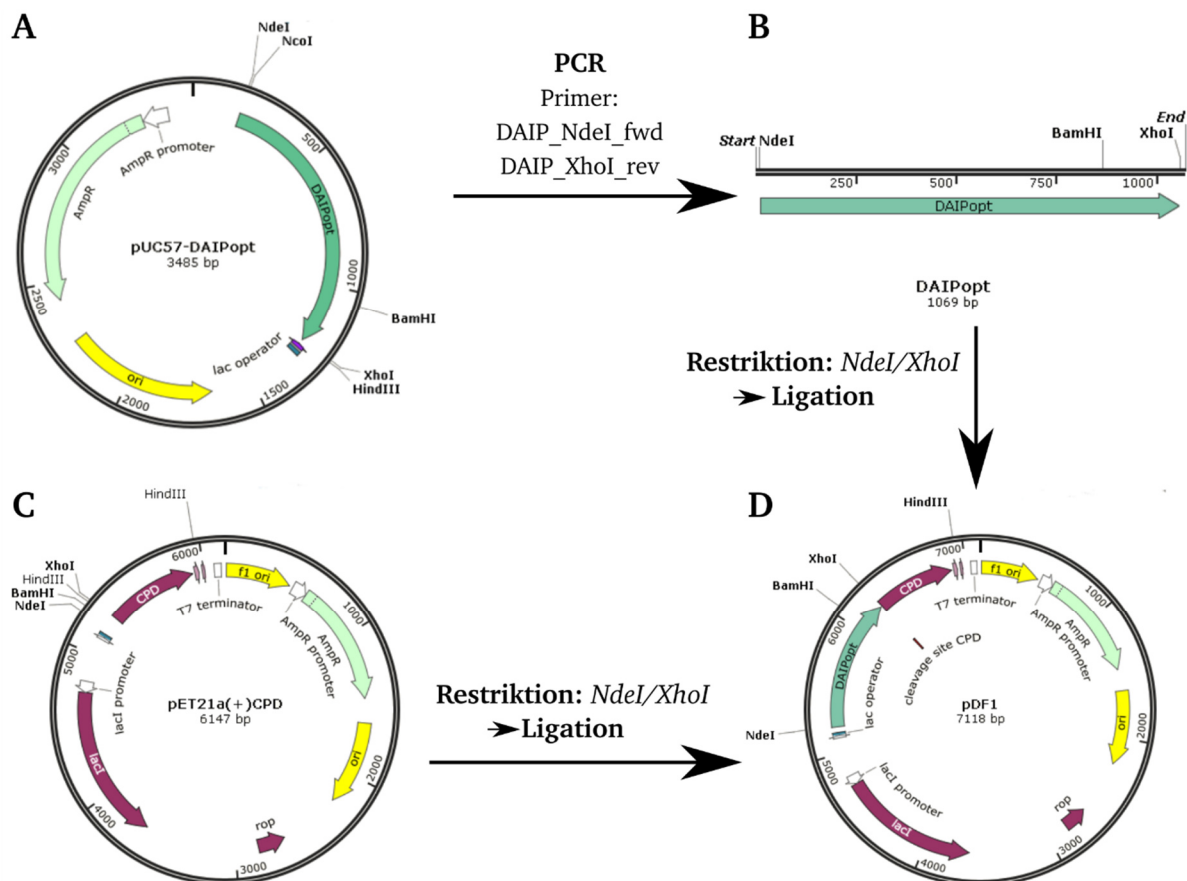
Die Bedingungen, unter denen die Kristallisationsexperimente in Braunschweig durchgeführt wurden, sind publiziert (siehe aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen, Seite 2) und in der PDB-Datenbank unter den Einträgen **5FZP** (DAIP) und **6FHP** (DAIP-Thermolysinfragment) hinterlegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Struktur von DAIP und Charakterisierung der Glutaminbindestellen für die Modifikation durch *Sm*-TG

#### 4.1.1. Gentechnische Vorarbeiten zur rekombinanten Produktion von DAIP und dessen Varianten

Für die rekombinante Produktion von DAIP und dessen Varianten wurde zunächst das codierende Gen aus *S. mobaraensis* (Genbank ID: HF968455.1) für die Expression in *E. coli* von der Firma Genscript codonoptimiert synthetisiert und in den Shuttle-Vektor pUC57 kloniert (s. Anhang). Das Plasmid pUC57-DAIP<sub>opt</sub> diente dann als Matrize für die Amplifikation der codierenden Sequenz von DAIP<sub>opt</sub> mit den Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I über die Primer DAIP\_*Nde*I\_fwd und DAIP\_*Xho*I\_rev (Abb. 4.1A, B).



**Abb. 4.1 Klonierungsstrategie für die Herstellung des Expressionsvektors pDF1 zur Produktion von rDAIP.** Durch Amplifikation des DAIP<sub>opt</sub>-Gens aus pUC57 (A) über PCR mit den angegebenen Primern wurden die Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Xho*I eingeführt (B). Durch Restriktion von pET21a(+)-CPD (C) und dem DAIP<sub>opt</sub>-Amplifikat (B) mit den beiden Restriktionsenzymen und anschließender Ligation mittels T4-Ligase wurde der Expressionsvektor pDF1 generiert (D). Dieser diente als *Template* für alle darauf aufbauenden rDAIP-Varianten (pDF2-18). Die Identität wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die Restriktion des generierten Amplifikats und des Expressionsvektors pET21a(+)-CPD, welcher die codierende Sequenz für eine Cystein-Protease-Domäne enthält, erfolgte für 16 h bei 37 °C (Abb. 4.1, B und C). Nach Reinigung der Restriktionsansätze wurde das *Insert* mit der codierenden Sequenz in den linearisierten Vektor über Ligation mit der ATP-abhängigen T4-Ligase integriert, wodurch der



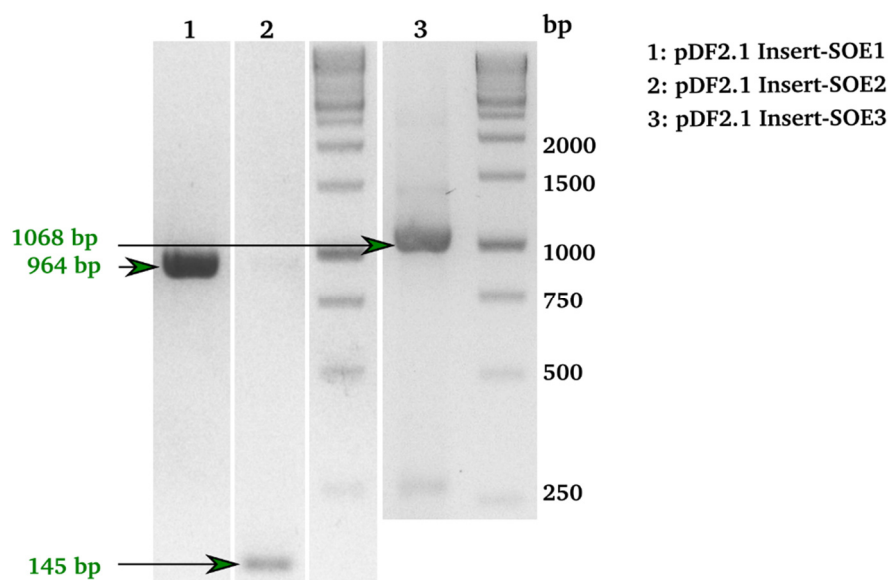
Expressions- und Klonierungsvektor pDF1 hergestellt wurde. Die Genexpression steht dabei unter der Kontrolle des starken T7-Promoters, dessen Repressor sich mit IPTG entfernen lässt.

Zur Untersuchung und kinetischen Charakterisierung der *Sm*-TG-Glutaminbindestellen von DAIP wurden zunächst Varianten generiert, welche jeweils nur noch eine der insgesamt fünf Glutamin-Bindestellen enthielten (Q<sub>1</sub>-Varianten). Zur Herstellung der Expressionsvektoren für die Produktion der unterschiedlichen Glutamin-Varianten von DAIP wurde ausgehend von pDF1 über SOE-PCR der sukzessive Austausch der übrigen Glutamine (Q) gegen Asparagine (N) durchgeführt (Tab. 4.1).

**Tab. 4.1 Expressionsvektoren der Glutamin-Mangelvarianten von rDAIP**

Bezeichnung	Modifikationen	Bemerkung
pDF1	-	Q <sub>5</sub>
pDF2	Q65/144/298/345N	Q39
pDF2.1	Q65/144/298/345N, GT36/37EE	Q39-lo1
pDF2.2	Q65/144/298/345N, TL37/38YF	Q39-lo2
pDF3	Q39/144/298/345N	Q65
pDF4	Q39/65/298/345N	Q144
pDF5	Q39/65/144/345N	Q298
pDF6	Q39/65/144/298N	Q345
pDF7	Q39/65/144/298/345N	Q <sub>0</sub>

Da die modifizierten Amplifikate mit dem gleichen Verfahren erhalten wurden, ist nachfolgend die SOE-PCR zur Herstellung des *Inserts* für pDF2.1 ausgehend von pDF2 exemplarisch dargestellt (Abb. 4.2). Die Durchführung erfolgte wie in 3.3.4 beschrieben mit den Primer-Paaren *DAIP\_NdeI\_fwd* & *DAIP\_GT36/37EE\_rev*, *DAIP\_GT36/37EE\_fwd* & *DAIP\_XhoI\_rev* bzw. *DAIP\_NdeI\_fwd* & *DAIP\_XhoI\_rev*. Das so generierte Amplifikat wurde anschließend ebenfalls mit *NdeI* und *XhoI* geschnitten und in den linearisierten Vektor pET21a(+)CPD über Ligation integriert.

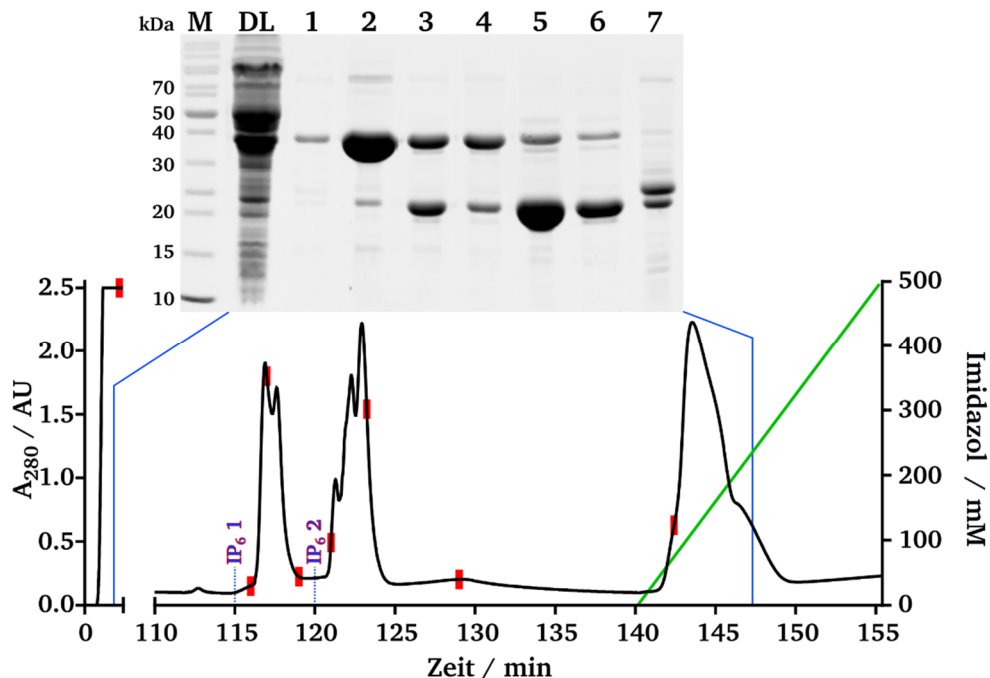


**Abb. 4.2 SOE-PCR zur Generierung des *Inserts* für den Expressionsvektor pDF2.1 mit dem Gen *DAIP<sub>Opt</sub>*. pDF2 war Matrize für die PCR. Spur 1, SOE1 für pDF2.1 mit den Primern *DAIP\_NdeI\_fwd* und *DAIP\_GT36/37EE\_rev*. Spur 2, SOE2 für pDF2.1 mit den Primern *DAIP\_GT36/37EE\_fwd* und *DAIP\_XhoI\_rev*. Spur 3, SOE3 für pDF2.1 mit den Primern *DAIP\_NdeI\_fwd* und *DAIP\_XhoI\_rev*.**

Neben der Einbringung der codierenden Sequenzen zur Produktion von *Tag*-freien Varianten in pET21a(+)CPD, wurden die codierenden Sequenzen von DAIP zudem über die *Nco*I- und *Xho*I-Schnittstellen mittels Ligation in den Expressionsvektor pET22b(+) integriert, welcher eine pelB-Signalpeptidsequenz und einen His<sub>6</sub>-Tag enthält (pDF19). So lagen letztlich alle codierenden Sequenzen zur Expression von rDAIP und dessen Glutamin-Varianten als Fusionsprotein rDAIP-CPD-His<sub>10</sub> oder rDAIP-His<sub>6</sub> vor. Erste Untersuchungen mit rDAIP-His<sub>6</sub> zeigten jedoch, dass der C-terminal fusionierte Hexahistidin-Tag die Inaktivierung von Bacillolysin negativ beeinflusste, weshalb im Weiteren die *Tag*-freie Variante des DAIP für Untersuchungen genutzt wurde.

#### 4.1.2. Produktion und Reinigung von rDAIP

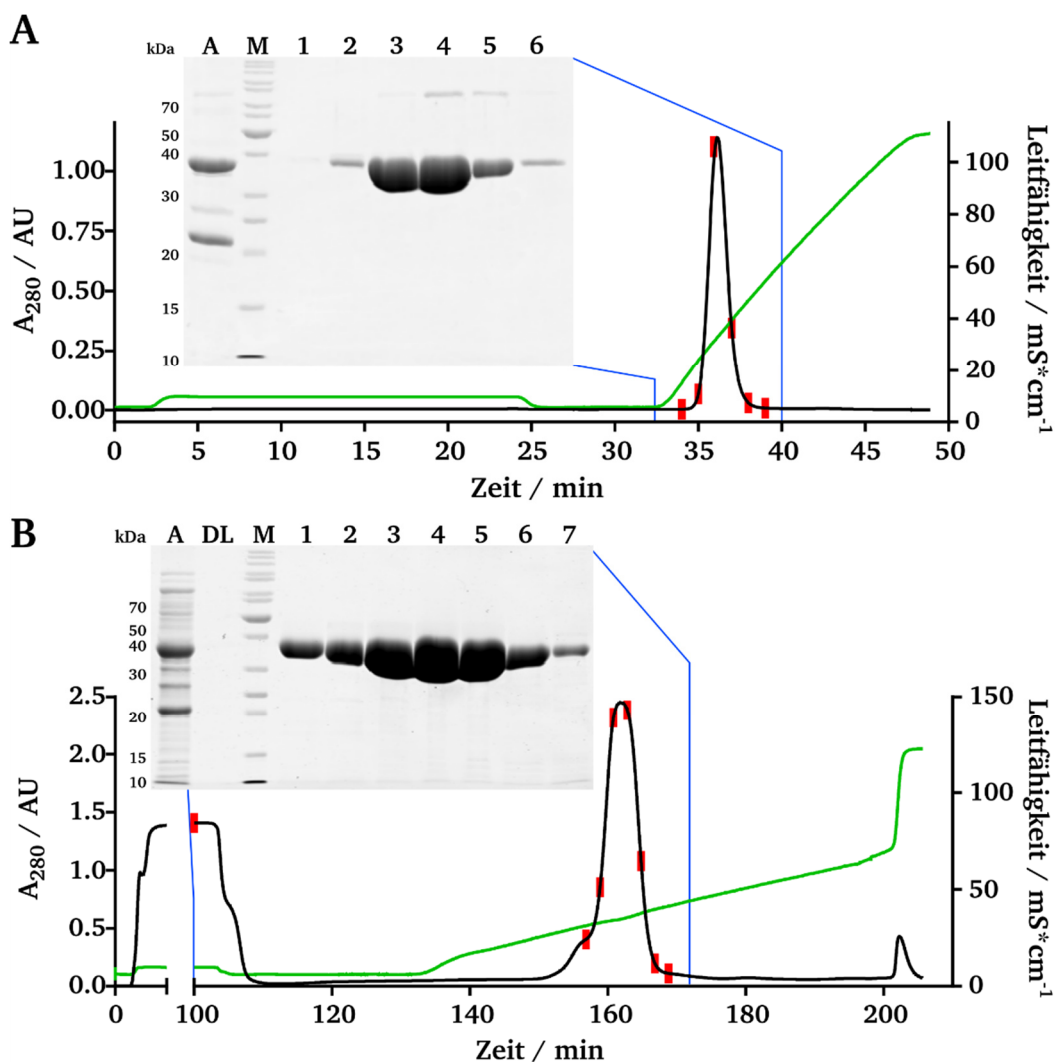
Die rekombinante Produktion des Fusionsproteins rDAIP-CPD erfolgte in der Regel in *E. coli* BL21 (DE3), welcher mit dem entsprechenden Plasmid transformiert war, im Maßstab von 3x1 L SB-Medium und einer Induktionsdauer von 16 h bei 28 °C. Nach der Ernte über Zentrifugation wurde das Zellpellet in Aufschlusspuffer aufgenommen, mit Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation bei 4 °C von Zelltrümmern befreit. Sterilfiltrierte Lysatproteine wurden anschließend mit einer HisTrap HP-Säule getrennt. Die Spaltung des gebundenen CPD-Fusionsproteins und Elution von rDAIP erfolgte durch Inkubation mit Phytinsäure (IP<sub>6</sub>) bei pH 8.0 direkt auf der Säule für 45 min (IP<sub>6</sub> 1) und weitere 30 min (IP<sub>6</sub> 2) bei RT (Abb. 4.3, Spuren 1-6). CPD-freies DAIP zeigte eine Proteinbande bei etwa 37 kDa.



**Abb. 4.3 IMAC-Reinigung des Fusionsproteins rDAIP-CPD und Spaltung mit Phytinsäure (IP<sub>6</sub>).** Zur Produktion von rDAIP wurden die pDF1-tragenden *E. coli* BL12 (DE3)-Zellen in 3x1 L SB-Medium für 16 h mit 500 µM IPTG bei 28 °C induziert. Das Zelllysate in Aufschlusspuffer (3.1.8) wurde mit 1 ml\*min<sup>-1</sup> auf eine mit 50 mM Tris pH 7.5 und 150 mM NaCl äquilibrierte 1-ml-HisTrap HP-Säule gegeben. Nach Auftragung und Elution unspezifischer Proteine erfolgte eine zweifache Inkubation von 45 min (IP<sub>6</sub> 1) und 30 min (IP<sub>6</sub> 2) mit jeweils 50 µM Phytinsäure bei RT. Die Elution des gespaltenen rDAIPs erfolgte bei 0.5 ml\*min<sup>-1</sup> mit Phytinsäure in Aufschlusspuffer (schwarze Linie). Die Elution der CPD wurde abschließend mit einem Imidazolgradienten von 0-500 mM durchgeführt (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; DL, Durchlauf (nach 5 min); 1-7, Fraktionen bei 116, 117, 119, 121, 123, 129 und 142 min (rote Balken).

Die Proteinbande bei etwa 22 kDa wurde hierbei als eine immer bei der Produktion von CPD-Fusionsproteinen auftretende Kontamination identifiziert, welche sich jedoch durch die darauffolgende CEX-Chromatographie (CEXC) leicht entfernen ließ. Abschließend erfolgte die Elution der CPD (Proteinbande bei etwa 25 kDa) und unspezifisch gebundener Proteine mit einem linearen Imidazol-Gradienten bis 500 mM (Abb. 4.3, Spur 7).

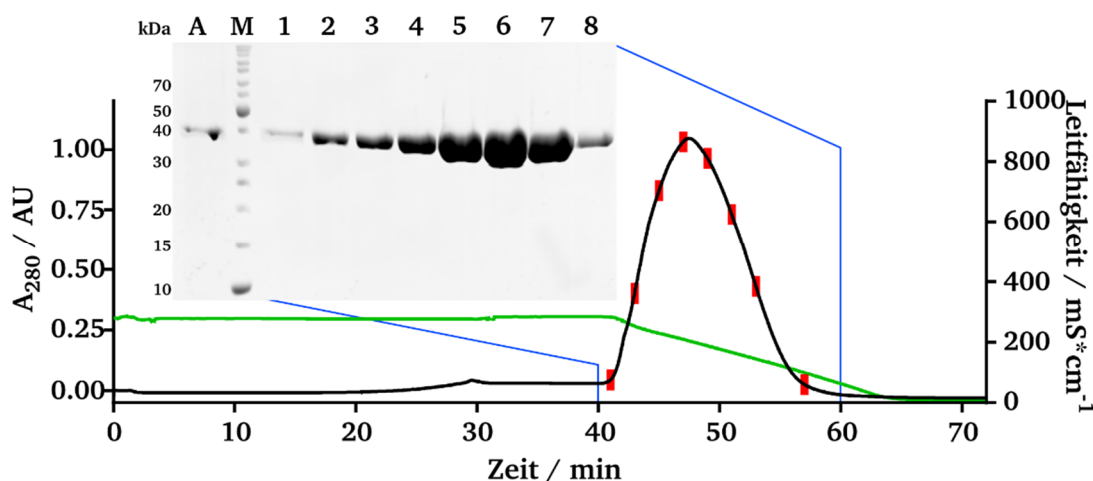
Die vereinigten Fraktionen zwischen 114 min und 130 min der IMAC wurden zur weiteren Aufarbeitung mit 200 mM Essigsäure auf pH 4.0 eingestellt, mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und auf eine 3-ml-Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Säule bei pH 4.0 aufgegeben (Abb. 4.4, A).



**Abb. 4.4 Kationenaustausch-Chromatographie (CEXC) des rDAIP-IMAC-Pools und -IMAC-Durchlaufs über Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> bei pH 4.0.** Die eluierten und vereinigten rDAIP-enthaltenden Fraktionen (A) bzw. der Durchlauf der IMAC aus Abb. 4.3 (B) wurden 1:4 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 200 mM Essigsäure auf pH 4.0 eingestellt. Die Aufgabe der Probe erfolgte jeweils mit 2 ml\*min<sup>-1</sup> auf eine 3-ml- (A) bzw. 28-ml-Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Säule (B), welche zuvor mit 50 mM Na-Acetat pH 4.0 äquilibriert worden war (schwarze Linie). Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0-1 M (A) bzw. 0-0.5 M NaCl (B) (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren A: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-6, Fraktionen bei 34, 35, 36, 37, 38 und 39 min (rote Balken). Spuren B: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; DL, Durchlauf (bei 100 min); 1-7, Fraktionen bei 157, 159, 161, 163, 165, 167 und 169 min (rote Balken).

Die hohe Absorption der nicht-bindenden CEX-Fraktion des IMAC-Durchlaufs bei 280 nm war mangels CBB-gefärbter Banden im SDS-PA-Gel auf die Eigenfärbung des Zelllysats zurückzuführen. Die Elution des gebundenen Proteins bei der CEXC erfolgte über einen linearen NaCl-Gradienten von 0-1 M. Wie in

Abb. 4.3 zu erkennen ist, befindet sich durch die lange Induktionszeit auch ein Teil des durch die phosphatinduzierte Basalaktivität der CPD geschnittenen freien rDAIPs im Durchlauf der IMAC. Zur Minimierung der Verluste wurde dieser daher ebenfalls auf pH 4.0 titriert, verdünnt, auf eine 28-ml- Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$ -Säule aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten bis 0.5 M eluiert (Abb. 4.4, B). Ein Vorteil der CEXC bei pH 4.0 bestand darin, dass ein Großteil der kontaminierenden *E. coli*-Proteine bei diesem niedrigen pH nicht stabil in Lösung blieb und so entweder vor oder während der Chromatographie präzipitierten (Abb. 4.4, A). Dieser Effekt begünstigte auch die Aufarbeitung des IMAC-Durchlaufs und erklärt die hohe Reinheit von DAIP nach der CEXC (Abb. 4.4, B). Die Reinheit des Proteins bestimmte auch, ob der Endreinigung über GPC noch eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit 1.5 M Ammoniumsulfat bei pH 7.5 vorgeschaltet wurde. So war es möglich, Kontaminationen zu entfernen, welche aufgrund ihres hydrodynamischen Radius über Größenausschluss nicht abzutrennen gewesen wären. Die Auftragsprobe wurde hierfür mit dem entsprechenden Salzgehalt versehen, auf pH 7.5 eingestellt und anschließend auf eine entsprechend äquilibrierte 1-ml-HiTrap Phenyl HP-Säule aufgegeben (Abb. 4.5).

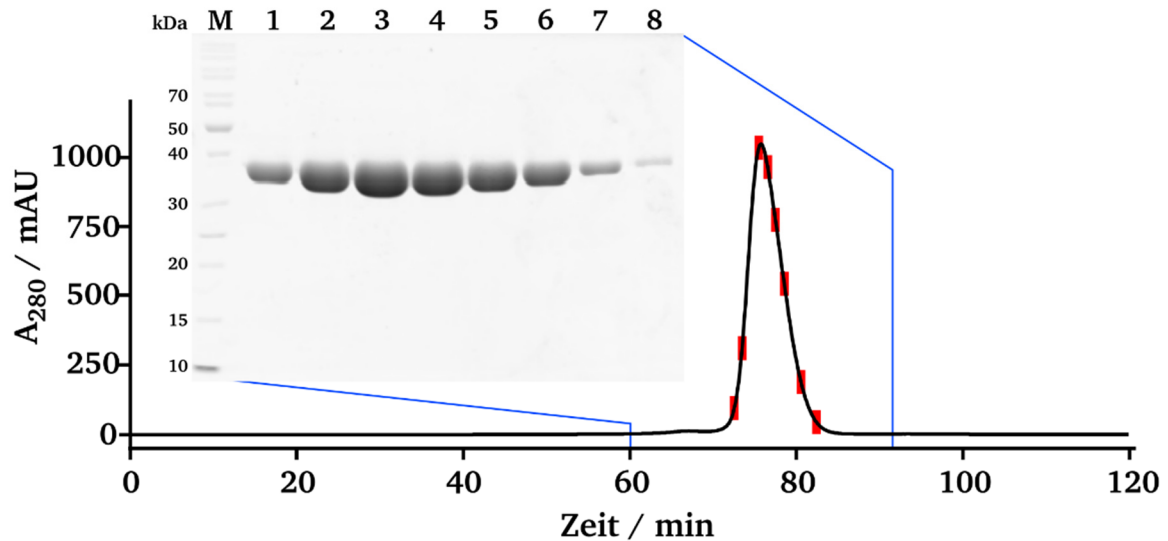


**Abb. 4.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie von rDAIP mit Phenyl-Sepharose bei pH 7.5.** Zur Aufgabe wurden die vereinigten Fraktionen nach CEXC zunächst mit 4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf eine Endkonzentration von 1.5 M eingestellt. Der Auftrag auf eine mit 50 mM Tris pH 7.5 äquilibrierten 1.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1-ml-HiTrap-Phenyl-HP-Säule erfolgte mit  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (schwarze Linie), die Elution der gebundenen Proteine über einen linearen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradient von 1.5-0 M über 25 CV (grüne Linie), die Auftrennung und Visualisierung der Proben über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-8, Fraktionen nach 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 und 57 min (rote Balken).

Die Trennleistung der HIC war im Vergleich zur IEX erheblich geringer, wie anhand des breiten Elutionsprofils in Abb. 4.5 zu erkennen ist, weswegen sie nur als eine der letzten Reinigungsstufen eingesetzt wurde.

Das veränderte Laufverhalten der Proben bei der SDS-PAGE war auf den hohen Ammoniumsulfatgehalt der entnommenen Fraktionen zurückzuführen, welcher vor dem letzten Chromatographieschritt über Dialyse gegen den Laufpuffer der abschließenden GPC reduziert wurde. Nach Dialyse unter mehrmaligem Pufferwechsel ü.N. bei  $4^\circ\text{C}$  wurde das Probenvolumen auf 1-2 ml reduziert und bei pH 8.0 mit Superdex75 aufgetrennt (Abb. 4.6). Die Fraktionen mit hochreinem DAIP nach 70 min bis 82 min und einem Maximum bei 75.8 min wurden vereinigt, aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zur

Langzeitlagerung und einfacherem Zugriff wurde gereinigtes DAIP gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert und lyophilisiert.



**Abb. 4.6** Endreinigung von rDAIP über Superdex75-Gelpermeationschromatographie bei pH 8.0. Die abschließende Reinigung und Umpufferung von rDAIP erfolgte auf einer Superdex75 16/600 pg bei einer Flussrate von 1 ml\*min<sup>-1</sup> in 50 mM Tris pH 8.0 mit 300 mM NaCl (schwarze Linie), die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-8, Fraktionen nach 72, 73, 75, 76, 77, 78, 80 und 82 min (rote Balken).

Eine Beeinträchtigung der Faltung und Tertiärstruktur der produzierten DAIP-Varianten durch den Aminosäurenaustausch wurde ausgeschlossen, da nur geringe Unterschiede in Bezug auf ihren Schmelzpunkt (N=2,  $\Delta T=0.1$ ) und inaktivierende Wirkung im Vergleich zum Wildtyp (*Sm-Q<sub>5</sub>*) beobachtet werden konnten (Tab. 4.2).

**Tab. 4.2** Ausbeute und Aktivität der rDAIP-Varianten mit ausgetauschten Glutaminen.

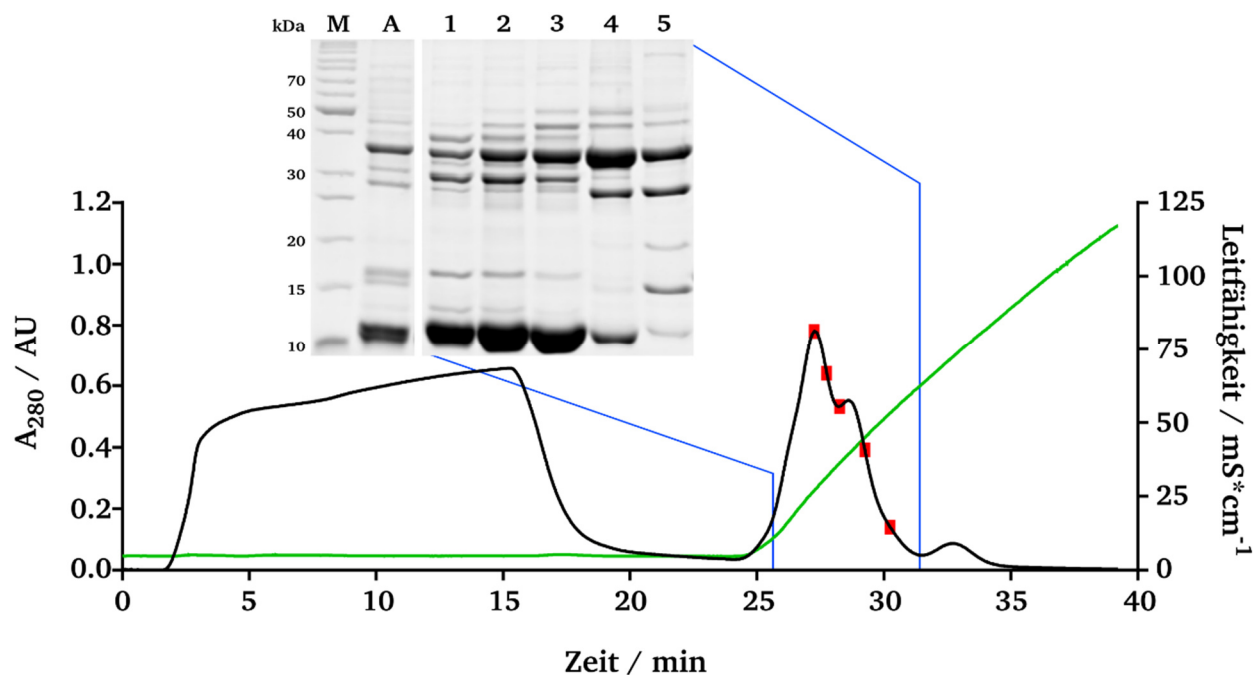
DAIP-Variante	Ausbeute <sup>a</sup> (mg*l <sup>-1</sup> )	Schmelzpunkt <sup>b</sup> (°C)	<i>DabSFans-Hydrolyse</i> <sup>c</sup>	
			EC <sub>50</sub> <sup>d</sup> (nM)	DAIP/Bacillolysin (Mol/Mol)
<i>wt</i> DAIP ( <i>Sm-Q<sub>5</sub></i> )	-	56.3	26.9 ± 1.2 <sup>e</sup>	0.135 ± 0.006
rDAIP ( <i>Q<sub>5</sub></i> )	25.0	56.5	21.3 ± 1.3 <sup>e</sup>	0.106 ± 0.007
Q39	11.2	55.9	16.5 ± 1.5 <sup>f</sup>	0.165 ± 0.015
Q39-lo1	2.5	55.7	39.8 ± 2.2 <sup>f</sup>	0.199 ± 0.011
Q39-lo2	2.1	52.3	21.4 ± 0.9 <sup>e</sup>	0.107 ± 0.005
Q65	8.3	60.6	14.6 ± 1.0 <sup>f</sup>	0.146 ± 0.010
Q144	3.8	54.1	27.5 ± 0.8 <sup>f</sup>	0.138 ± 0.004
Q298	3.7	53.0	25.6 ± 0.8 <sup>f</sup>	0.128 ± 0.004
Q345	6.3	53.7	29.2 ± 0.8 <sup>f</sup>	0.146 ± 0.004
Q <sub>0</sub>	1.5	56.4	15.3 ± 0.4 <sup>e</sup>	0.153 ± 0.004

<sup>a</sup> gereinigtes Protein pro Liter Kulturbrühe; <sup>b</sup> ermittelt über intrinsische Fluoreszenz (nanoDSF,  $\lambda_{\text{ex}}$  280 nm,  $\lambda_{\text{em.1}}$  330 nm,  $\lambda_{\text{em.2}}$  350 nm), N=2; <sup>c</sup> Dispase wurde 30 min bei 37 °C mit DAIP vorinkubiert und die Restaktivität über *DabSFans*-Hydrolyse bei 535 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm) verfolgt; <sup>d</sup> N=3; <sup>e</sup> 100 nM Dispase; <sup>f</sup> 200 nM Dispase.

Alle in dieser Arbeit produzierten rDAIP-Varianten wurden entsprechend aufgearbeitet und lagen so für ihre Charakterisierung und Anwendung in hoher Reinheit vor. Die Produktion und Reinigung von Wildtyp-DAIP aus *S. mobaraensis* (*Sm-Q<sub>5</sub>*) wurde in Anlehnung an Sarafeddinov *et al.*, 2009, durchgeführt.

#### 4.1.3. Produktion und Reinigung von *Sm*-TG

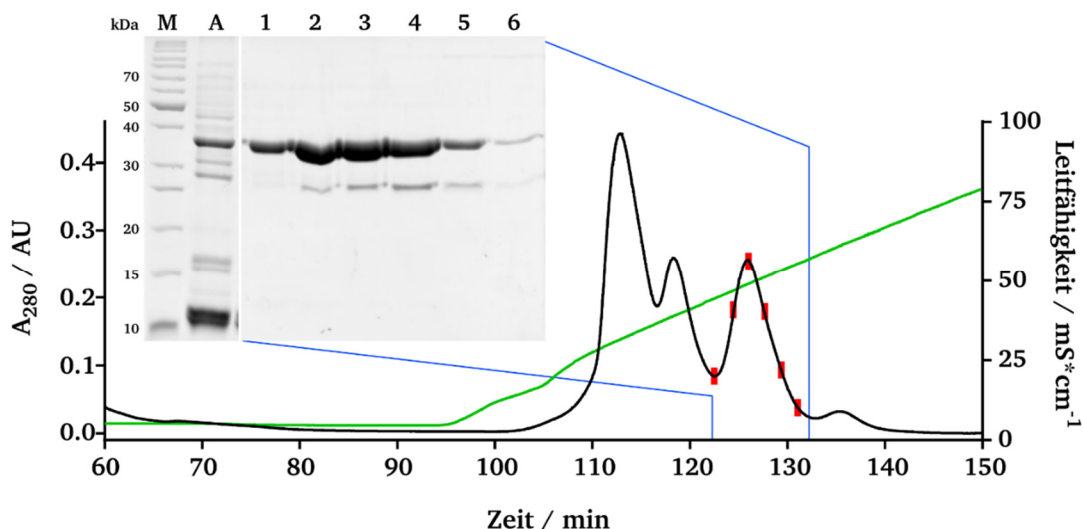
Die Produktion der Transglutaminase *Sm*-TG in *S. mobaraensis* erfolgte in Anlehnung an Gerber *et al.*, 1994, in 3x110 ml Komplexmedium mit Spurenelementlösung nach Voelskow für 72 h bei 28 °C und 110 rpm. [128, 189] Nach Abtrennung der Zellmasse über Büchnertrichter wurde der *Sm*-TG-beinhaltende Überstand fraktionierend mit -20 °C Ethanol zunächst bis 30% (v/v) vorgefällt. Durch Erhöhung auf 50% (v/v) Ethanol wurde anschließend das Vernetzungsenzym quantitativ gefällt und durch Zentrifugation bei 4 °C abgetrennt. Das Präzipitat wurde zur chromatographischen Trennung über CEXC in 50 mM Tris-Acetat pH 6.0 resuspendiert, steril-filtriert auf eine 3-ml-Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Säule gegeben und über einen linearen NaCl-Gradienten von 0-1 M eluiert. (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7** Kationenaustausch-Chromatographie (CEXC) des *Sm*-TG-Präzipitats aus *S. mobaraensis* bei pH 6.0. Ein 30-50% (v/v) Ethanolpräzipitat der Kulturbrühe wurde in 50 mM Tris-Acetat pH 6.0 aufgenommen und mit  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte 3-ml-Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Säule aufgegeben (schwarze Linie). Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0-1 M NaCl über 5 CV (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-6, Fraktionen nach 27½, 28, 28½, 29½ und 30½ min (rote Balken).

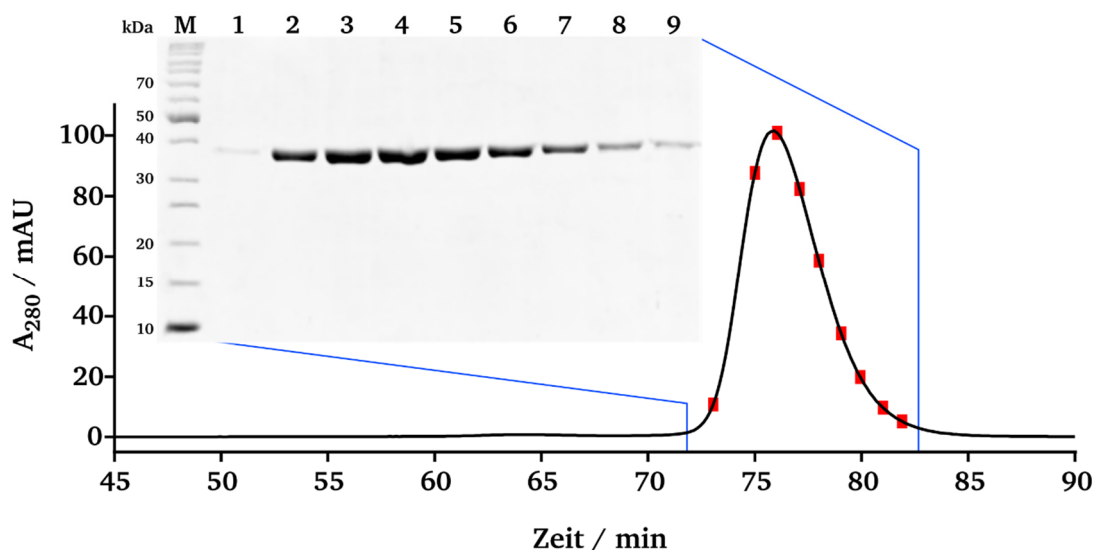
Durch die fraktionierende Vorfällung des Überstands und CEXC bei pH 6.0 konnte bereits vorab ein Großteil der kontaminierenden *S. mobaraensis*-Proteine abgetrennt und das Zielenzym angereichert werden. Die erste CEXC diente aufgrund ihres kleinen Säulenvolumens vornehmlich der Anreicherung des Zielenzyms. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Fraktionen nach 28 min bis 32 min vereinigt (Abb. 4.7) und mit einer zweiten CEXC bei pH 5.0 aufgetrennt (Abb. 4.8).





**Abb. 4.8** Zweite CEXC von *Sm*-Transglutaminase mit Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  bei pH 5.0. Die vereinigten Fraktionen der CEXC bei pH 6.0 wurden mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, auf pH 5.0 eingestellt und mit  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte 28-ml-Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$ -Säule aufgegeben (schwarze Linie). Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0-1 M NaCl über 6 CV (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; A, Auftrag; 1-6, Fraktionen nach 123, 125, 126, 127, 129 und 131 min (rote Balken).

Durch Absenkung des pH und Erhöhung des Säulenvolumens mit Anpassung des Gradienten konnte in der zweiten CEXC fast eine vollständige Abreicherung kontaminierender Proteine bis auf eine Bande bei etwa 27 kDa erzielt werden (Abb. 4.8). Die durch eine distinkte Bande bei etwa 38 kDa identifizierten *Sm*-TG-Fractionen nach 121 min bis 131 min wurden anschließend vereinigt, aufkonzentriert und abschließend über GPC bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  bei pH 8.0 aufgetrennt (Abb. 4.9).



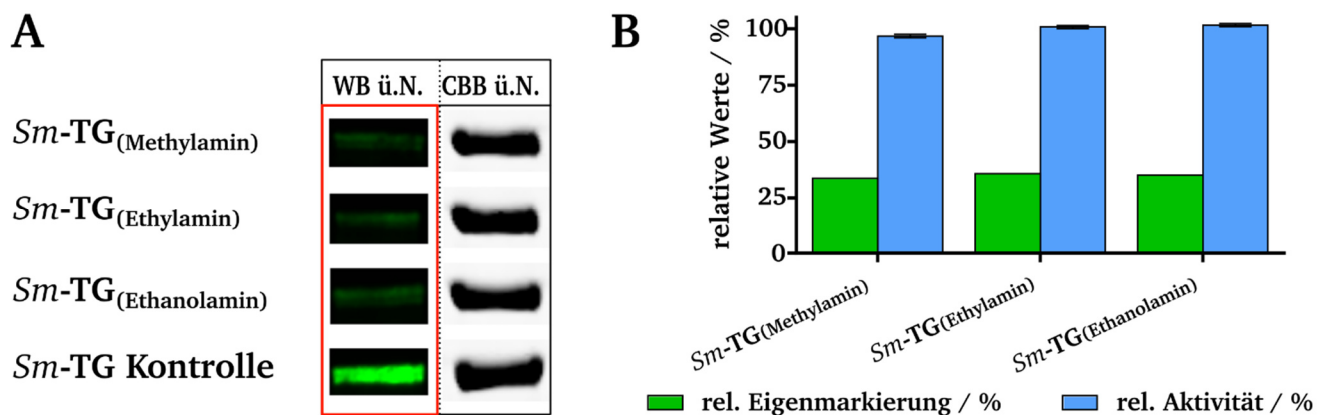
**Abb. 4.9** Finale Superdex75-Gelpermeationschromatographie von *Sm*-TG bei pH 8.0. Die abschließende Reinigung und Umpufferung von *Sm*-TG erfolgte auf einer Superdex75 16/600 pg bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  in 50 mM HEPES pH 8.0 mit 150 mM NaCl (schwarze Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-9, Fraktionen nach 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81 und 82 min (rote Balken).

Das Vernetzungsenzym eluierte unter den verwendeten Bedingungen zwischen 72 min und 82 min mit einem Peakmaximum bei 75.4 min. Nach Bestimmung der Reinheit des Proteins über SDS-PAGE und der Aktivität über HA-Assay ( $6.6 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) wurden die Fraktionen aliquotiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.



#### 4.1.4. Enzymatische Alkylierung von *Sm*-TG

Die Untersuchung und kinetische Charakterisierung der modifizierten rDAIP-Varianten hinsichtlich ihrer Acyl-Donor-Eigenschaften erfolgte innerhalb dieser Arbeit über die in 4.1.6 beschriebene Markierung mit MBC und anschließendes *Western Blotting*. *Sm*-TG und (r)DAIP besitzen jedoch ein ähnliches Molekulargewicht und sind durch Elektrophorese kaum trennbar. Zudem neigt das Vernetzungsenzym zum autokatalytischen Einbau von Lysinäquivalenten wie MBC. Trotz der in den Analyseansätzen verhältnismäßig geringen Enzymkonzentration, wurden zur eindeutigen Unterscheidung von biotinyliertem rDAIP die Glutaminreste von *Sm*-TG modifiziert. Da Transglutaminasen alkylierte Glutamine (Q-Substrat) nicht mehr als Acyl-Donor akzeptieren, erschien die autokatalytische Amidierung mit einem primären Amin als die geeignetste Methode dafür. <sup>[221]</sup> Hierzu wurde entsprechend 3.4.9 *Sm*-TG mit diversen Alkylaminen und dem Markierungsverstärker N-Lauroylsarcosin (LS) für mehrere Stunden bei pH 8.0 umgesetzt und überschüssiges Reagenz über Dialyse entfernt. Obwohl die Transglutaminase-Aktivität in allen Reaktionsansätzen vergleichbar mit der nicht-alkylierten Kontrolle war, konnte mit diesem Verfahren eine stark verminderte Eigenmarkierung des alkylierten Enzyms erreicht werden (Abb. 4.10). Diese äußerte sich durch eine ausgewertet verminderte Fluoreszenz-Zunahme und Endpunktintensität der *Sm*-TG-Banden nach immunchemischer Färbung mit einem Streptavidin-Fluorophor-Konjugat (Abb. 4.10, A).



**Abb. 4.10 Verminderte Eigenmarkierung von *Sm*-TG mit Monobiotinylcadaverin nach enzymatischer Glutamin-Alkylierung.** A, die modifizierten sowie das nicht-alkylierte Enzym (12  $\mu$ M) wurden mit 0.3 mM MBC in 100 mM HEPES pH 8.0 bei 37 °C bis zu 16 h inkubiert (ü.N.). Der Reaktionsabbruch erfolgte durch Denaturierung bei 95 °C in vor-temperiertem 5xSDS-AP. Die Ansätze wurden anschließend über SDS-PAGE (12.5%) getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und immunchemisch mit *IRDye® 800CW Streptavidin* gefärbt. B, die semi-quantitative Bestimmung der autokatalytischen Biotinylierung erfolgte entsprechend 0 durch Endpunktbestimmung der integrierten Bandenintensitäten aus A. Die *Sm*-TG-Aktivität wurde mit 4  $\mu$ M des Enzyms über den HA-Assay bestimmt.

Da der Einfluss auf die autokatalytische Eigenmarkierung bei allen untersuchten alkylierten Enzymen vergleichbar auf etwa 35% reduziert werden konnte, wurde für die kinetischen Untersuchungen mit rDAIP die mit Methylamin umgesetzte Variante, im Folgenden als *Sm*-TG<sub>Met</sub> bezeichnet, verwendet.

#### 4.1.5. Ermittlung der *Sm*-TG-Glutaminbindestellen von DAIP

Das Dispersautolyse-induzierende Protein wurde bereits 2009 von Sarafeddinov *et al.* als intrinsisches Q- und K-Substrat von *Sm*-TG identifiziert und stellt damit ein ideales Werkzeug zur näheren Charakterisierung der bisher immer noch weitestgehend unbekannten Spezifität des Vernetzungsenzyms dar. Das reife DAIP besteht aus insgesamt 348 AS, welches über ein vorangestelltes 26mer Signalpeptid von *S. mobaraensis* sezerniert wird. Die Primärsequenz von DAIP mit den 5 potentiellen Q- und 10 K-Substrat-Bindestellen für *Sm*-TG, ist nachfolgend in Abb. 4.11 und Tab. 4.3 dargestellt. Aufgrund der generell sehr breiten Akzeptanz des modifizierenden Enzyms hinsichtlich des K-Substrats beschränkte sich diese Arbeit auf die Untersuchung der Glutaminreste von DAIP, welche bei der Proteinvernetzung den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor darstellen.

```

-26          1          14
MKRMGWAVTA AVTTIVLAQS SLAAQAADST SGWRAPSCTK VTGDGAVTFT TDDGATLAPT
          39          65          76
TGTLQSVSYT HGLVALDTPN TLLATHNDEL QRSTDAGCTW TKVATLGSGS TWLTAATGGR
          100          115          130          144
AFAWEKNGGY LARVDGRTVT KLSSPSADIV GVGTDKARRD HVRLAGSDGQ LYDSTDAGAT
          156 160          214
WKPLGKLAFG PGASVYTVSF DPADLDHAVA GGMTTGGAVT TDGGATWTAA TGLSATAGGK

SNLFAASVSP ADRNVVYALG IDLVEAAPNS GAEGRHLYRS TDGGRTYTRI VDDTPDELT
          298          313 316
NSTLLAPSPV DPNVLYFEYG TYFYAYGTDL YRYDARTGKV GKTHNAHDGI SAIAFNPARP
          345
SVMYLGLEEV QIHH

```

**Abb. 4.11 Primärsequenz des Dispersautolyse-induzierenden Proteins von *S. mobaraensis*.** Durch Edman-Abbau und Massenspektrometrie bestimmte Aminosäuren sind unterstrichen. <sup>[62]</sup> Cysteine und potentielle Bindestellen von *Sm*-TG sind farblich in grün, orange (Glutamine) und blau (Lysine) hervorgehoben.

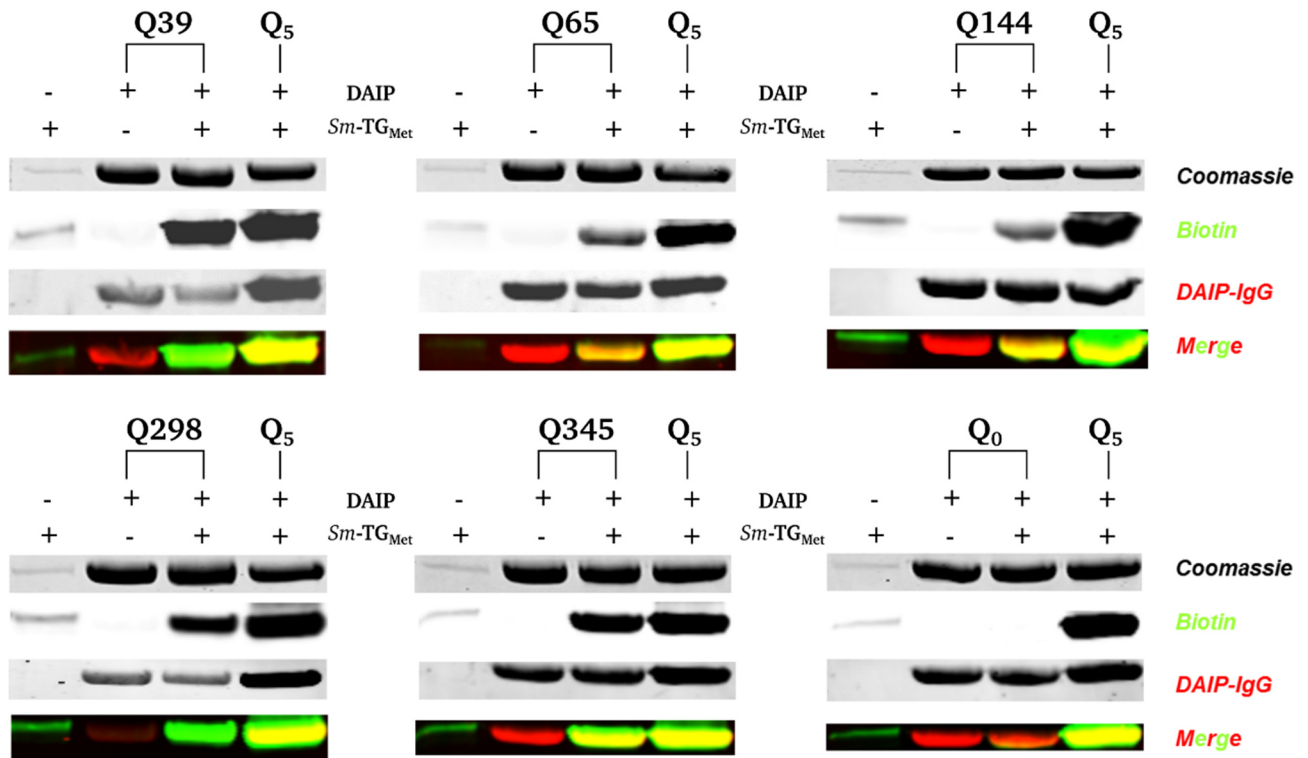
**Tab. 4.3 Flankierende Aminosäuren der Glutamine und Lysine des DAIP**

Glutamin-Umgebung			Lysin-Umgebung					
-5	-1		+1	+5		-5	-1	
TTGTL	Q39	SVSYT	APSCT	K14	VTGDG	AGATW	K156	PLGKL
HNDEL	Q65	RSTDA	GCTWT	K76	VATLG	WKPLG	K160	LAFGP
AGSDG	Q144	LYDST	AFAWE	K100	NGGYL	ATAGG	K214	SNLFA
YGTYF	Q298	AYGTD	GRTVT	K115	LSSPS	DARTG	K313	VGKTH
GLEEV	Q345	IHH--	GVGTD	K130	ARRDH	TGKVG	K316	THNAH

Nachdem rDAIP (Q<sub>5</sub>), die  $\Delta Q_4/\Delta Q_5$ -defizienten Varianten Q39, Q65, Q144, Q298, Q345 und Q<sub>0</sub> sowie *Sm*-TG<sub>Met</sub> in hoher Reinheit vorlagen, wurde zunächst eine qualitative Beurteilung der Substrateigenschaften der Einzel-Glutamin-Varianten des rDAIP durchgeführt. Hierfür wurden 8  $\mu$ M DAIP mit 0.5  $\mu$ M *Sm*-TG<sub>Met</sub> und 1 mM MBC für 2 h bei 37 °C umgesetzt, über SDS-PAGE getrennt und nach Proteintransfer mit einem Streptavidin-Fluorophorkonjugat gefärbt (Abb. 4.12).

Die qualitative Biotinylierung der Einzel-Glutamin-Varianten von DAIP ergab, dass jedes der insgesamt fünf Glutamine eine Bindestelle von *Sm*-TG<sub>Met</sub> ist und mit MBC unter den verwendeten Bedingungen konjugiert werden kann. Die Varianten Q39, Q298 und Q345 zeigten durch die Streptavidin-

Fluoreszenzsonde stark gefärbte Banden, welche diese Glutamine als die präferierten *Sm*-TG-Vernetzungsstellen identifizierte. Weiterhin wurden Q65 und Q144, wenn auch in geringerem Maße, durch *Sm*-TG biotinyliert. Bei der Q<sub>0</sub>-Variante, welche kein Glutamin mehr enthielt, war hingegen keine Biotinylierung zu beobachten, wodurch unspezifische Adsorption des Biotinderivats durch DAIP ausgeschlossen wurde.

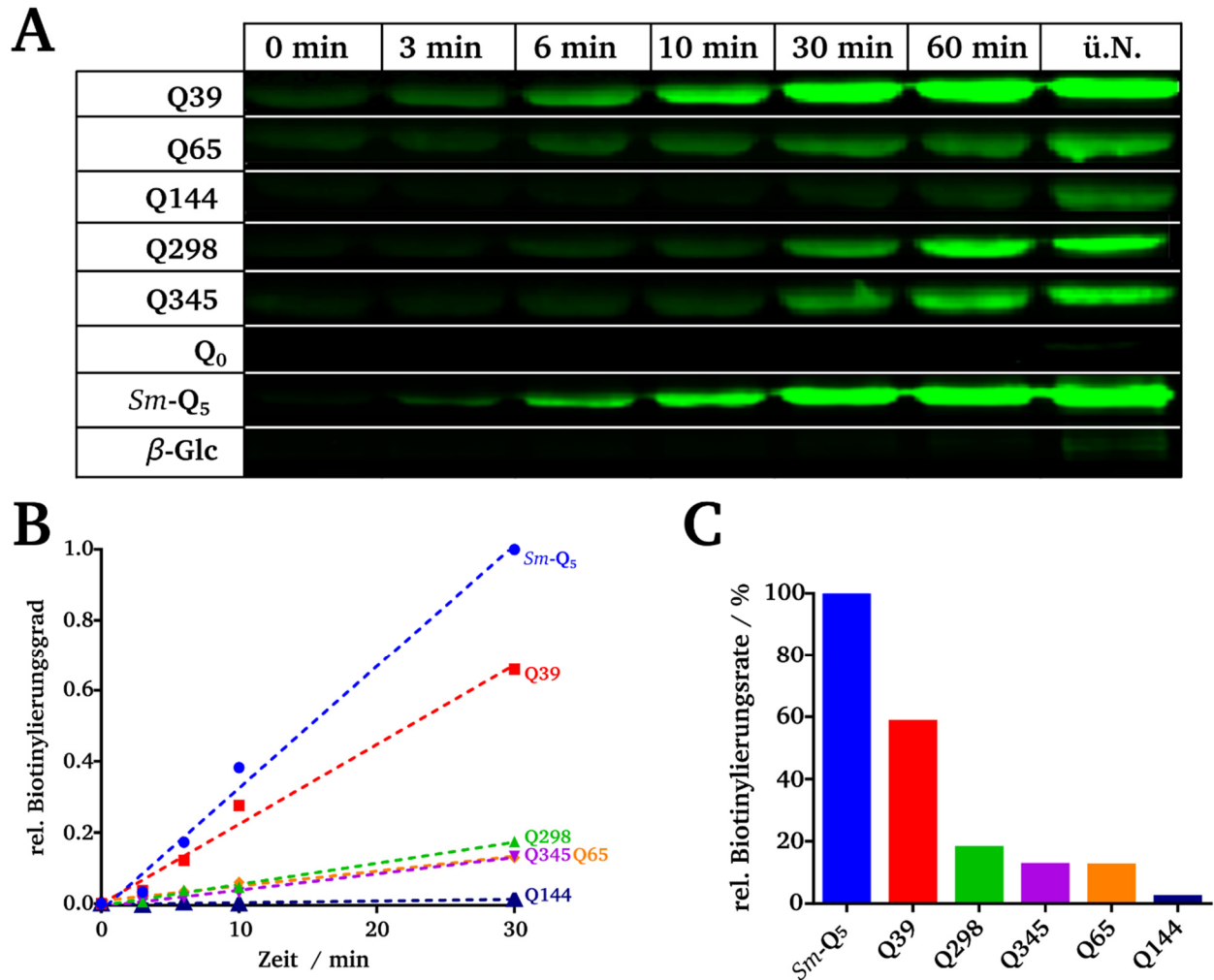


**Abb. 4.12 *Sm*-TG-vermittelte Biotinylierung der rDAIP-Varianten** (publiziert in Fiebig *et al.*, 2016).<sup>[222]</sup> In den Reaktionsansätzen wurden 8  $\mu$ M DAIP-Q39, -Q65, -Q144, -Q298, -Q345 und -Q<sub>0</sub> sowie als Kontrolle wt-rDAIP (Q<sub>5</sub>) mit 0.5  $\mu$ M *Sm*-TG<sub>Met</sub> und 1 mM MBC für 2 h bei 37 °C in 100 mM HEPES pH 8.0 inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Denaturierung bei 95 °C in vortemperiertem 5x *red*. SDS-AP mit anschließender Auftrennung über SDS-PAGE (12.5%) und Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Die immunchemische Färbung zum Nachweis von DAIP und der Biotinylierung erfolgte jeweils mit anti-DAIP-IgG in Kombination mit *IRDye*<sup>®</sup> 680LT *Goat anti-Rabbit IgG* als Zweitantikörper bzw. dem Streptavidin-Fluorophorkonjugat *IRDye*<sup>®</sup> 800CW *Streptavidin* nach 3.5.5.

#### 4.1.6. Charakterisierung der *Sm*-TG-Glutaminbindestellen von DAIP

Zur genaueren Charakterisierung der Glutaminbindestellen wurde anschließend die Biotinylierung der einzelnen Varianten durch *Sm*-TG<sub>Met</sub> kinetisch untersucht. Dabei dienten für die entsprechende Normierung *Sm*-Q<sub>5</sub> als Positivkontrolle und die Q<sub>0</sub>-Variante als Negativkontrolle. Als weitere Kontrolle wurde eine  $\beta$ -Glucosidase aus der Mandel *Prunus dulcis* mitgeführt, welche, trotz einer Vielzahl potentiell reaktiver Glutamine, nicht durch *Sm*-TG markiert bzw. umgesetzt wird. Die Reaktionsansätze enthielten 8  $\mu$ M DAIP bzw.  $\beta$ -Glucosidase und 0.2 mM MBC. Durch Zugabe von 0.5  $\mu$ M *Sm*-TG<sub>Met</sub> wurde die Reaktion gestartet und bis zu 16 h (ü.N.) bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, denaturiert und über Protein-Blot analysiert (Abb. 4.13, A). Eine bereits nach 3 min zu beobachtende Zunahme der Banden-Fluoreszenz zeigte, dass Q39 fast genauso schnell wie das Wildtyp-Protein *Sm*-Q<sub>5</sub> biotinyliert wird. Im Gegensatz dazu erschienen intensiv gefärbte

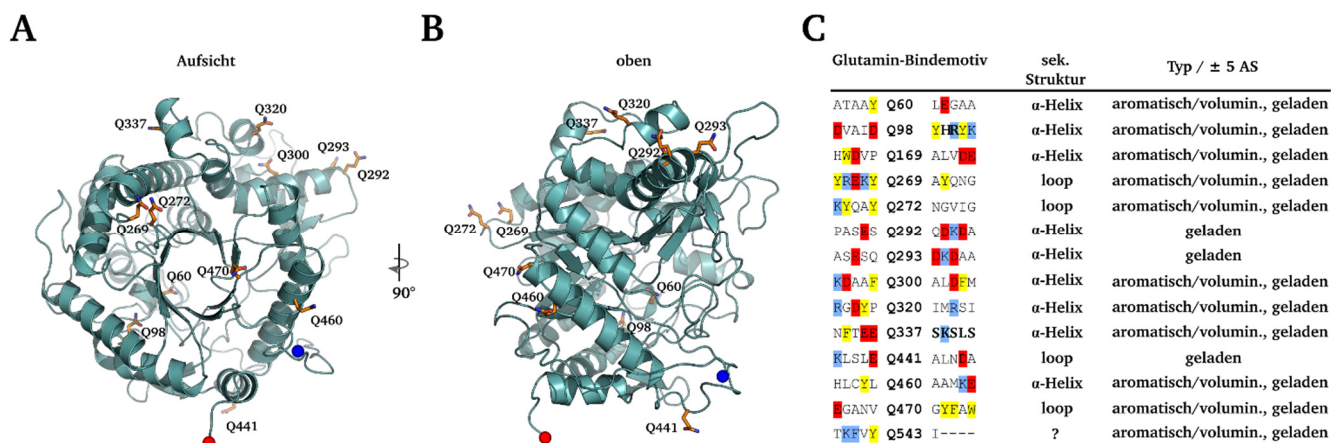
Banden bei Q298 und Q345 erst nach einer Reaktionsdauer von 30 min. Die *Sm*-TG-vermittelte Konjugation des biotinylierten Amins MBC mit Q65 und Q144 fand hingegen mit einer noch niedrigeren Umsatzgeschwindigkeit statt. Die Kontrollen Q<sub>0</sub> sowie  $\beta$ -Glucosidase ( $\beta$ -Glc) zeigten erwartungsgemäß mangels Streptavidin-Bindung die Abwesenheit geeigneter *Sm*-TG-Bindestellen.



**Abb. 4.13** Gln39 ist die bevorzugte *Sm*-TG-Glutaminbindestelle (publiziert in Fiebig *et al.*, 2016).<sup>[222]</sup> A, zeitabhängige enzymatische Biotinylierung von rDAIP-Varianten mit *Sm*-TG<sub>Met</sub>. 8  $\mu$ M der angezeigten DAIP-Varianten wurden mit 0.2 mM MBC und 0.5  $\mu$ M *Sm*-TG<sub>Met</sub> für bis zu 16 h bei 37 °C in 100 mM HEPES pH 8.0 inkubiert und Proben zu den angegebenen Zeitpunkten nach Abschnitt 0 über Protein-Blot analysiert. B, Auftragung des auf *Sm*-Q<sub>5</sub> normierten zeitabhängigen Biotinylierungsgrads der angezeigten DAIP-Varianten. C, absteigend sortierte relative Biotinylierungsraten der rDAIP-Varianten nach dem 30-min-Markierungsgrad im Vergleich zum Wildtyp-DAIP *Sm*-Q<sub>5</sub>.

Das Enzym  $\beta$ -Glc wurde trotz insgesamt 14 Glutaminen, von denen, nach einem *Phyre2*-Homologie-Modell basierend auf der verwandten  $\beta$ -Glucosidase aus *Oryza sativa*, mindestens 10 dem Wasser zugewandt sind, nicht von dem Vernetzungsenzym umgesetzt (Abb. 4.14, A und B). Schwache Banden der Kontrollproteine wurden erst nach einer Inkubation über Nacht sichtbar. In der für die Analyse ausgewerteten Zeitspanne bis 30 min war bei allen Varianten ein linearer Anstieg der Emissionsintensität und damit des auf *Sm*-Q<sub>5</sub> normierten Biotinylierungsgrades zu beobachten (Abb. 4.13, B). Die höchste Biotinylierungsrate wurde für Wildtyp-DAIP aus *S. mobaraensis* (*Sm*-Q<sub>5</sub>) ermittelt, welches sich in einer Fluoreszenzzunahme von 278 rf<sub>u</sub>\*min<sup>-1</sup> (100%) ausdrückte (Abb. 4.13, C). Die enzymatische Kopplung von MBC an die DAIP-Glutamin-Varianten war im Vergleich dazu langsamer, jedoch zeigte sich, dass

Gln39 mit  $159 \text{ rfu} \cdot \text{min}^{-1}$  die mit Abstand beste Glutamin-Bindestelle für *Sm*-TG ist. Ähnliches Proteinblotting und Biotinorientierung vorausgesetzt, konnte die *Sm*-TG-Präferenz für die DAIP-Glutamine wie folgt ermittelt werden: Gln39 ( $159 \text{ rfu} \cdot \text{min}^{-1}$ , 57.2%) >> Gln298 ( $48 \text{ rfu} \cdot \text{min}^{-1}$ , 17.5%) > Gln345 ( $33.4 \text{ rfu} \cdot \text{min}^{-1}$ , 12.0%) ~ Gln65 ( $32.8 \text{ rfu} \cdot \text{min}^{-1}$ , 11.8%) >> Gln144 ( $5 \text{ rfu} \cdot \text{min}^{-1}$ , 1.8%) (Abb. 4.13, C).



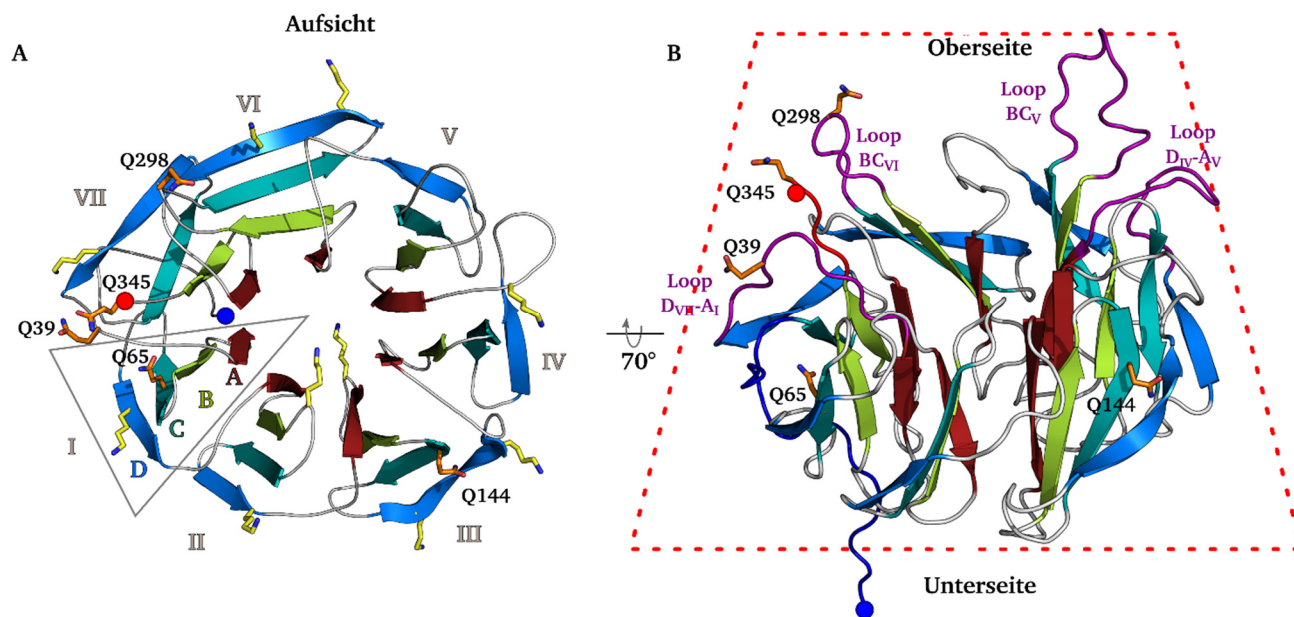
**Abb. 4.14 β-Glucosidase wird trotz wasserzugänglicher Glutamine nicht von *Sm*-TG modifiziert (publiziert in Fiebig et al., 2016).<sup>[222]</sup>** A und B, Strukturmodell der β-Glucosidase aus der Mandel *Prunus dulcis* (Uniprot-ID: H9ZGE0) (Phyre2-Homologie-Modell basierend auf PDB ID: 3PTK, 62% Sequenzidentität bei 478 von 544 alignierten Aminosäuren). β-Glucosidase ist in türkis als Cartoon dargestellt. 13 der 15 im reifen Protein vorhandenen Glutamine (Gln4 befindet sich im Signalpeptid und Gln543 ist im Phyre2-Modell nicht dargestellt), von denen mindestens 10 wasserzugänglich erscheinen, sind in orange hervorgehoben. Die N- und C-Termini sind jeweils durch blaue bzw. rote Kugeln hervorgehoben. C, flankierende AS der 14 Glutamine von β-Glucosidase. Aromatische/voluminöse AS sind gelb gefärbt und positiv- bzw. negativ-geladene AS sind in blau bzw. rot dargestellt.

#### 4.1.7. Aufklärung der Tertiärstruktur von DAIP

Um einen Einblick in die Gesamtstruktur, die Lage der einzelnen Glutamine und Lysine von DAIP sowie strukturelle Besonderheiten zu gewinnen, welche eine effiziente Modifikation durch *Sm*-TG begünstigen, wurde die Tertiärstruktur des Proteins ermittelt. Die Strukturaufklärung des DAIP aus *S. mobaraensis* erfolgte in Kooperation mit Dr. Stefan Schmelz und Dr. Andrea Scrima vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig über Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von  $1.7 \text{ \AA}$  (Abb. 4.15, PDB ID: 5FZP).<sup>[222]</sup> Aufgrund der zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht bekannten Struktur von DAIP war ein molekularer Ersatz nicht möglich, weshalb der Aufbau über *Ytterbium single-wavelength anomalous diffraction* (Yb-SAD) von Dr. Schmelz und Dr. Scrima gelöst wurde. DAIP präsentierte sich dabei als klassischer *seven-bladed β-propeller* (Abb. 4.15, A). Eine Besonderheit der Struktur zeigte sich in der Bildung einer cis-Peptidbindung zwischen Ser40 und Val41. Im Gegensatz zu den Propellerblättern (*Blades*) I-VI, welche aus jeweils vier β-Faltblättern A-D bestehen, setzt sich das letzte Propellerblatt VII aus zwei β-Faltblättern des C-Terminus (A-B, AS 326-340) und zwei β-Faltblättern des N-Terminus (C-D, AS 20-35) zusammen. Die beiden Elemente der Termini greifen dabei „Klettverschluss-artig“ ineinander und bilden so Propellerblatt VII, welches die ringförmige Propellerstruktur schließt und gleichzeitig stabilisiert. Weiterhin wird die Struktur über die Ausbildung



einer Disulfidbrücke zwischen Cys12 und Cys72 stabilisiert, welche das N-terminale Peptid des DAIP an Position 12 mit dem  $\beta$ -turn zwischen  $C_I$  und  $D_I$  (AS 68-74) des ersten Propellerblatts verbindet.  $\beta$ -Propeller besitzen in der Regel stets eine Unter- und eine Oberseite, welche sich aus der trapezförmigen Struktur des Proteins in der Seitenansicht ableiten lässt (Abb. 4.15, B). Auf der Oberseite des Propellers befinden sich vier verlängerte flexible *Loop*-Bereiche ( $D_{IV-A_V}$ ,  $BC_V$ ,  $BC_{VI}$  und  $D_{VII-A_I}$ ), von denen  $D_{VII-A_I}$  und  $BC_{VI}$  jeweils die Glutamine Gln39 bzw. Gln298 enthalten.



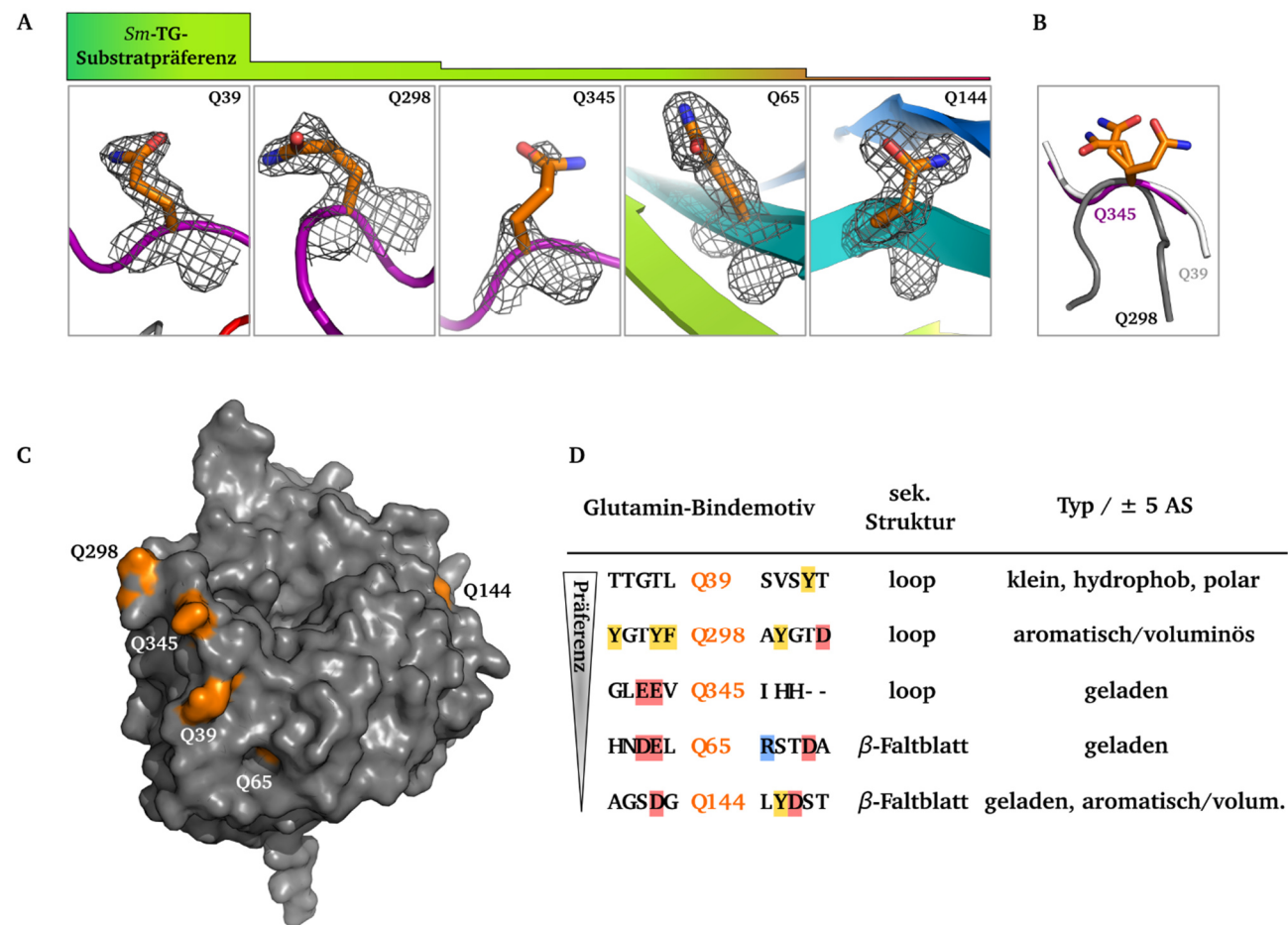
**Abb. 4.15** Die Kristallstruktur des DAIP zeigt einen *seven-bladed  $\beta$ -propeller* und gibt Einblick in die strukturellen Voraussetzungen effizienter *Sm*-TG-Bindestellen (publiziert in Fiebig *et al.*, 2016).<sup>[222]</sup> A, Aufsicht auf den *seven-bladed  $\beta$ -propeller* DAIP in Cartoon-Darstellung (PDB ID: 5FZP). Die Propellerblätter I-VI setzen sich aus jeweils vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern *A-D* zusammen. *Blade* VII besteht hingegen aus zwei  $\beta$ -Faltblättern des C-Terminus (*A* und *B*) und zwei des N-Terminus (*C* und *D*). Lysine (gelb) und Glutamine (orange) sind in *Stick*-Form herausgestellt. N- und C-Termini sind jeweils mit roten bzw. blauen Kugeln markiert. B, Seitenansicht von DAIP (70° Rotation relativ zu A). Vier ausladende *Loops* sind in lila hervorgehoben. Die *Loops*  $D_{VII-A_I}$  und  $BC_{VI}$  enthalten jeweils die Glutamine Gln39 und Gln298. Die N- und C-terminalen *Loops* sind jeweils blau bzw. rot dargestellt.

Die Struktur gab so erste Einblicke in die Orientierung und Lage der *Sm*-TG-Glutaminbindestellen des intrinsischen Substrats DAIP. Bemerkenswerterweise befinden sich vier der insgesamt fünf Glutamine, nämlich Q39, Q65, Q298 und Q345, gehäuft auf der Oberseite des Propellers in geringem Abstand zueinander (Abb. 4.15, A und B). Diese vier Glutamine wurden auch von *Sm*-TG am schnellsten biotinyliert (Abb. 3.13). Die 10 vorhandenen Lysine hingegen sind über die gesamte Oberfläche des Proteins gleichmäßig verteilt, ohne eine bevorzugte molekulare Umgebung aufzuzeigen. Im Gegensatz zu den wasserexponierten Glutaminen Gln39, Gln298 und Gln345, befinden sich Gln65 und Gln144 in den  $\beta$ -Faltblättern  $C_I$  bzw.  $C_{III}$  und sind dort weniger zugänglich.

#### 4.1.8. *Sm*-TG-Glutamin-Umsatz in Relation zur molekularen Umgebung

Die kinetischen Daten der Biotinylierung korrelieren größtenteils mit der Zugänglichkeit der jeweiligen Glutamine in der DAIP-Struktur. Die am schnellsten umgesetzten und markierten Glutamine Gln39 und Gln298 sind durch ihre Lage in den *Loops*  $CV_{II-A_I}$  und  $BC_{VI}$  am stärksten exponiert. Sie befinden sich in

räumlicher Nähe auf der Oberseite des  $\beta$ -Propellers und weisen damit die höchste Wasserzugänglichkeit auf (Abb. 4.16, A-C). Obwohl der Zugang von *Sm*-TG zu Gln345 durch die Flexibilität des C-terminalen Peptids ungehindert stattfinden sollte, wird es nur unbedeutend schneller markiert als das verdeckte Gln65. Das schlechteste Glutamin-Substrat in DAIP stellt Gln144 dar, welches im Vergleich zu den übrigen Glutaminen auf der gegenüberliegenden Seite an der Oberseite von Propellerblatt III liegt. Diese molekularen Verhältnisse gaben erste Hinweise auf Spezifität und katalytische Effizienz von *Sm*-TG gegenüber einem Substratprotein. Gln65 und Gln144 mit stark reduzierter Zugänglichkeit sind Teil geordneter  $\beta$ -Faltblattstrukturen, während sich die übrigen Glutamine in einer ausgedehnten *Loop*-Struktur (Q39), einem exponierten  $\beta$ -turn (Q298) oder am C-Terminus (Q345) befinden. So ließ sich die direkte molekulare Umgebung der Bindestelle als erste Determinante für die *Sm*-TG-Spezifität und Effizienz identifizieren. Generell scheint damit die mit der Lage in  $\beta$ -Faltblättern einhergehende geringere Flexibilität auch für die stark reduzierte Markierbarkeit von Gln65 und Gln144 durch *Sm*-TG verantwortlich zu sein.



**Abb. 4.16 Gln39 vereint die strukturellen und molekularen Voraussetzungen für eine effiziente Modifikation durch *Sm*-TG (publiziert in Fiebig *et al.*, 2016).<sup>[222]</sup>** A, Nahaufnahme der fünf Glutaminbindestellen (sortiert nach absteigender Substratpräferenz von *Sm*-TG dargestellt über einen Farbgradienten von grün nach rot). Die verfeinerte Elektronendichte ist für jedes Glutamin in grau dargestellt. B, Überlagerung der *Loop*-Regionen von Gln39, Gln298 und Gln345 basierend auf dem Glutamin-Peptidrückgrat und den C $\beta$ -Atomen. C, Oberflächenillustration von DAIP zur Darstellung des *Clusterings* und der Zugänglichkeit der einzelnen Glutamine (orange). D, flankierende AS der 5 Glutamine von DAIP. Aromatische/voluminöse AS sind gelb gefärbt und positiv- bzw. negativ-geladene AS sind in blau bzw. rot hervorgehoben.



---

Glutaminreste in flexibleren Proteinregionen werden vermutlich grundsätzlich bevorzugt. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurde die Lage und Orientierung der drei besten *Sm*-TG-Bindestellen, Gln39, Gln298 und Gln345, über das Proteinrückgrat miteinander verglichen (Abb. 4.16, B).

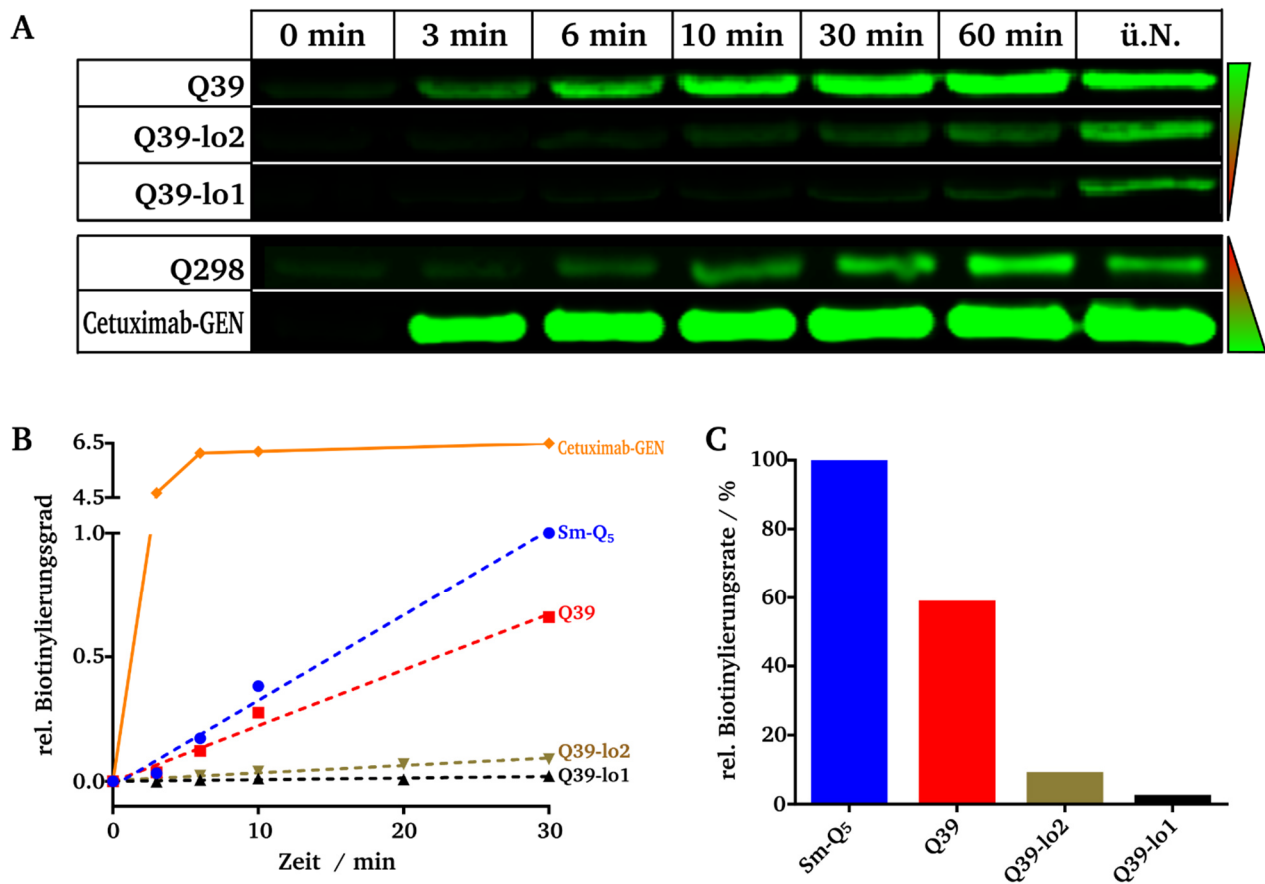
Dabei zeigten sich, durch Vergleich der Glutamine sowie der flankierenden AS, hohe konformationelle Ähnlichkeiten zwischen Gln39 und Gln345. Die Konformation der Bindestelle Gln298 unterschied sich jedoch signifikant von den Vorhergenannten, obwohl die Umsatzeffizienz zwischen beiden lag (grau dargestellt). Vermutlich verhinderte der exponierte, aber starre  $\beta$ -Turn eine bessere Biotinylierungseffizienz von Gln298 im Vergleich mit Gln39 in einer wesentlich flexibleren Umgebung. Flexibilität ist offensichtlich eine Voraussetzung für die *Sm*-TG-Bindung und eine effiziente Modifikation. Eine Modulation erfolgt darauf aufbauend jedoch auch zu einem großen Teil über die flankierenden Aminosäuren. Als nächstes wurde daher die Primärsequenz und die Zusammensetzung der glutaminumgebenden Aminosäuren ( $\pm 5$  AS) der Haupt-Bindestellen näher analysiert (Tab. 4.3 und Abb. 4.16, D). Die beste Bindestelle, Gln39, ist hauptsächlich von kleinen polaren bzw. hydrophoben Aminosäuren umgeben. Gln298 wird demgegenüber von insgesamt drei aromatischen bzw. voluminösen Seitenketten umgeben, und dem terminalen Gln345 gehen zwei negativ geladene Glutamate voraus. Sie bestätigen die Annahme von Kashiwagi *et al.*, 2002, dass Glutamine in direkter Nachbarschaft zu kleinen und hydrophoben Aminosäuren am effizientesten und welche, die von geladenen Aminosäuren umgeben sind, am schlechtesten durch *Sm*-TG modifiziert werden. Die Anwesenheit voluminöser bzw. aromatischer Seitenketten in der näheren Umgebung reduziert zwar ebenfalls die Umsatzgeschwindigkeit, ist aber gegenüber einer geladenen Umgebung günstiger. So ließ sich auch die ineffiziente Modifikation von  $\beta$ -Glucosidase erklären, bei der die nach dem Modell in *Loops* liegenden Glutamine entweder von aromatischen/voluminösen und/oder von geladenen Aminosäuren umgeben sind (Abb. 4.14, C).

Für die Überprüfung der abgeleiteten *Sm*-TG-Spezifität wurden, in Nachahmung der flankierenden Aminosäuren von Gln298 und Gln345, zwei Q39-Varianten untersucht, bei denen Thr37 und Leu38 gegen Tyrosin und Phenylalanin (Q39-lo2) bzw. Gly36 und Thr37 gegen zwei Glutamate (Q39-lo1) ausgetauscht wurden (vgl. Tab. 4.1; Abb. 4.17). Im Vergleich zu Q39 zeigten beide abgeleiteten Varianten einen stark verminderten Umsatz durch *Sm*-TG, welcher sich durch eine viel geringere Intensitätszunahme der Banden ausdrückte. Nach 16 h Reaktionsdauer wurde weder bei Q39-lo1 noch Q39-lo2 annähernd ein vergleichbarer Biotinylierungsgrad erreicht.

Durch Einbringung der aromatischen Aminosäuren wurde die Biotinylierungsrate im Vergleich zu *Sm*-Q<sub>5</sub> um 92% (85% bzgl. Q39) reduziert, wohingegen der Effekt der beiden negativ geladenen Aminosäuren etwas stärker ausgeprägt war und in einer Reduktion um 98% (97% bzgl. Q39) resultierte.

Parallel zu dieser Arbeit wurde durch Siegmund und Kollegen auf Grundlage der nativen *Sm*-TG-Bindestelle Gln298 von DAIP ein *Sm*-TG-Tag für die effiziente Konjugation eines *Reporters* an einen

monoklonalen Antikörper entwickelt. Daraus resultierte die modifizierte Variante von Cetuximab der Firma Merck, Cetuximab-GEN, welche jeweils C-terminal an den schweren Ketten das Bindemotiv *GENTYFQAYGNTE* trug.<sup>[223]</sup> Im direkten Vergleich von Q298 und Cetuximab-GEN zeigte sich auf eindrucksvolle Weise, dass, trotz des identischen Bindemotivs, die Effizienz und Umsatzgeschwindigkeit einer Bindestelle sehr stark von der Position innerhalb eines Proteins abhängig ist. Die Markierung der Glutaminbindestelle Gln298 in DAIP-Q298 wird demnach maßgeblich von zwei Faktoren, nämlich dem starren  $\beta$ -Turn und den voluminösen AS in direkter Umgebung beeinflusst. Diese verlieren jedoch an Bedeutung, wenn sich das Segment terminal befindet.



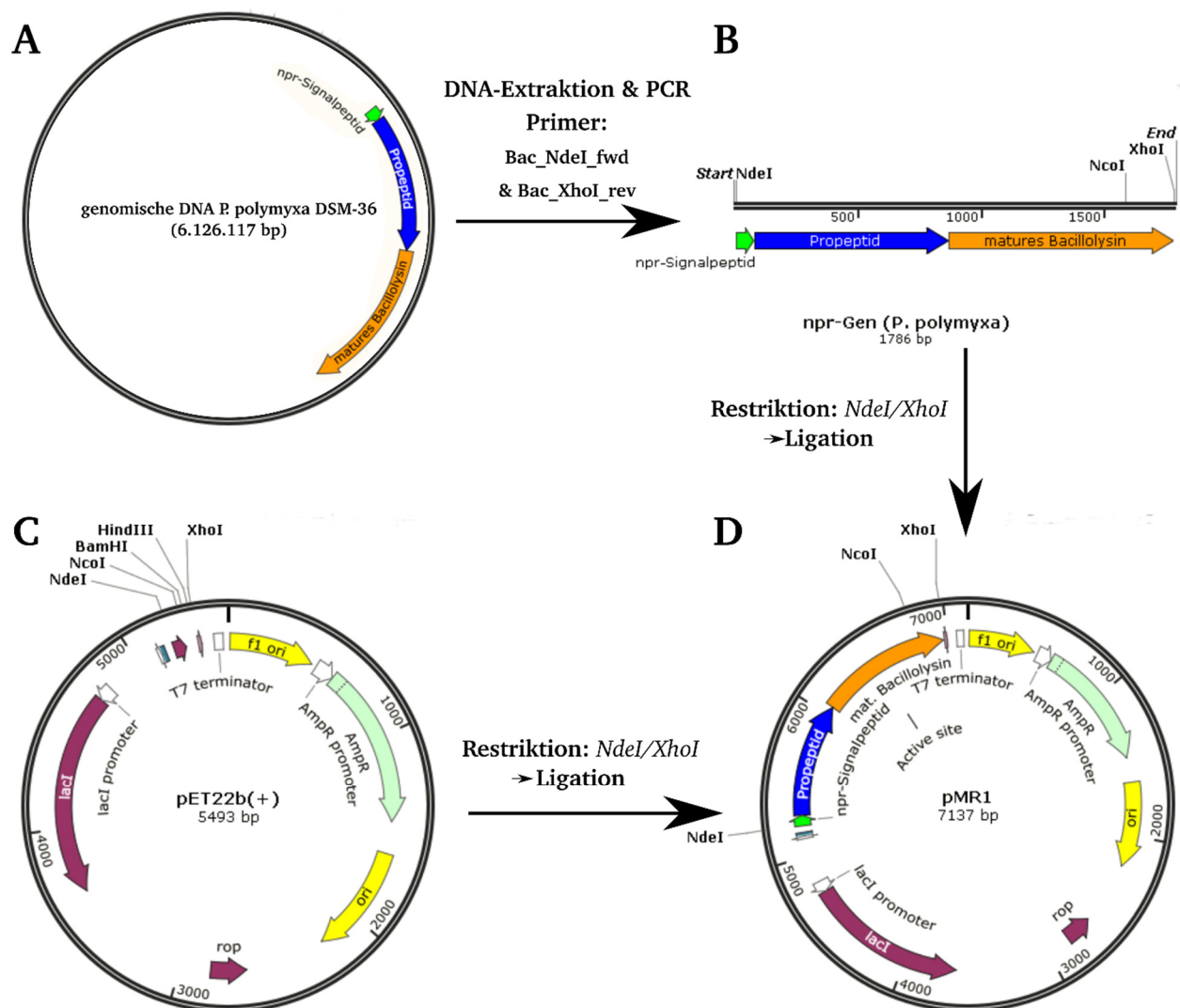
**Abb. 4.17 Position und molekulare Umgebung der Bindestelle dirigieren maßgeblich die *Sm*-TG-Effizienz.** A, zeitabhängige enzymatische Biotinylierung der rDAIP-Q39-Varianten und Cetuximab-GEN mit C-terminalem Q298-DAIP-Tag<sup>[223]</sup> durch *Sm*-TG<sub>Met</sub>. 8  $\mu$ M der DAIP-Q39-Varianten bzw. des modifizierten Antikörpers wurden mit 0.2 mM MBC und 0.5  $\mu$ M *Sm*-TG<sub>Met</sub> für bis zu 16 h bei 37 °C in 100 mM HEPES pH 8.0 inkubiert und Proben zu den angegebenen Zeitpunkten entsprechend 0 über Western Blot analysiert. B, Auftragung des ermittelten und auf *Sm*-Q<sub>5</sub> normierten zeitabhängigen Biotinylierungsgrades der DAIP-Q39-Varianten und Cetuximab-GEN. C, absteigende relative Biotinylierungsraten der rDAIP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-DAIP *Sm*-Q<sub>5</sub>.

Nur wenn das Glutamin in einer starren (Q298) oder begrenzt flexiblen Umgebung (Q39) anzutreffen ist, spielen auch die großen Reste eine stärkere Rolle. Der maximale Biotinylierungsgrad von Cetuximab-GEN, welcher bereits nach etwa 6 min erreicht wurde, lag normiert auf *Sm*-Q<sub>5</sub> nach 30 min bei etwa 6.5. Die relative Biotinylierungsrate konnte aufgrund der hohen Geschwindigkeit nicht hinlänglich bestimmt, jedoch mit dem 40fachen der Referenzrate ungefähr abgeschätzt werden.

## 4.2. Aufklärung des Katalyse-Mechanismus von DAIP und Identifikation neuer Zielproteasen

### 4.2.1. Gentechnische Vorarbeiten zur rekombinanten Produktion von aktiven und nicht-funktionellen M4-Metalloproteasen

Im Zuge der Aufklärung und näheren Charakterisierung des Mechanismus von DAIP wurde zunächst für die rekombinante Produktion der namensgebenden M4-Metalloprotease Bacillolysin (*Dispase*) als Matrize die genomische DNA von *P. polymyxa* DSM-36 extrahiert. Mittels entsprechender Primer wurde anschließend die codierende Sequenz des *npr*-Gens inklusive Signal- und Propeptid mit den Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I amplifiziert (Abb. 4.18, A und B).

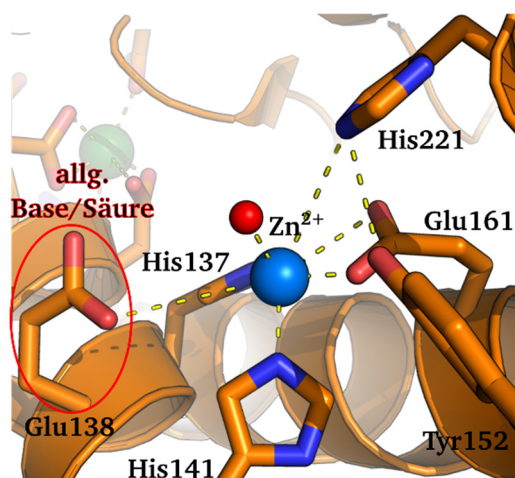


**Abb. 4.18** Klonierungsstrategie für die Herstellung eines Expressionsvektors zur Produktion von M4-Metalloproteasen am Beispiel von rBacillolysin. Nach Extraktion genomischer DNA wurde das *npr*-Gen aus *P. polymyxa* (A) mittels PCR über die angegebenen Primer mit den Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Xho*I amplifiziert (B). Durch Restriktion von pET22b(+) (C) und dem *npr*-Amplifikat (B) mit den beiden Restriktionsenzymen und anschließender Ligation mittels T4-Ligase wurde der Expressionsvektor pMR1 generiert (D). Dieser diente als *Template* für alle Bacillolysin-basierenden Vektoren (pMR1-7). Die Identität wurde jeweils durch Sequenzierung bestätigt.

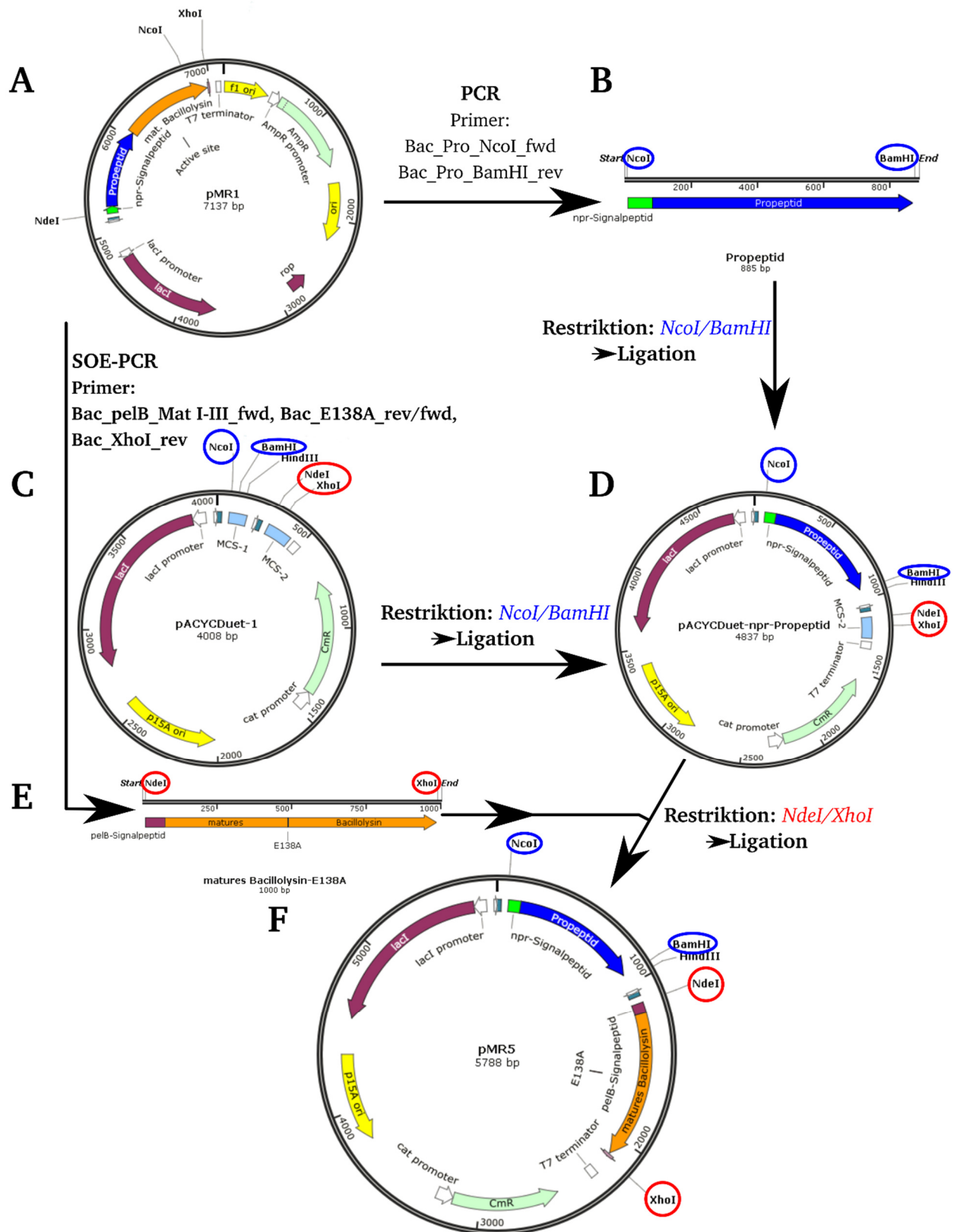
Die Restriktion des generierten Amplifikats und des Expressionsvektors pET22b(+), welcher einen His<sub>6</sub>-Tag enthält, erfolgte für 16 h bei 37 °C (Abb. 4.18, B und C). Die anschließende Ligation der

gereinigten DNA resultierte im Expressionsvektor pMR1 für die Produktion von aktivem rBacillolysin mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag. Analog zu pET21a(+)CPD steht die Expression bei pET22b(+) ebenfalls unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors. Die Sequenzierung zeigte, dass das *npr*-Gen des Stammes DSM-36 einige Punktmutationen im Vergleich zu der bei Uniprot hinterlegten Sequenz von Bacillolysin (P29148) aufwies (Abb. 7.2). Aufgrund der ansonsten gleichen Eigenschaften der Genprodukte wurde das amplifizierte Gen jedoch für die weiteren Untersuchungen weiterverwendet. Neben rBacillolysin wurden in dieser Arbeit auch die M4-Metalloproteasen von *S. aureus* (Aureolysin), *P. aeruginosa* (Pseudolysin, LasB) und aus *B. thermoproteolyticus* *rokko* (Thermolysin) sowie Varianten dieser Proteine rekombinant produziert und untersucht. Da die Klonierungswege sich in der Regel nicht unterscheiden, werden im Folgenden nur die Änderungen gegenüber dem Verfahren von rBacillolysin sowie dessen nicht-funktioneller Variante rBacillolysin-E183A erwähnt. Im Gegensatz zu rBacillolysin dienten zur Amplifikation der codierenden Sequenzen der übrigen Proteasen jeweils die durch die Firma Biocat codon-optimiert synthetisierte DNA für Aureolysin (Uniprot-ID: P81177, Gen: *aur*), Pseudolysin (Uniprot-ID: P14756, Gen: *lasB*) bzw. Thermolysin (Uniprot-ID: P00800, Gen: *nprT*) als Matrize. Abweichend wurde die codierende Sequenz von Aureolysin nach dem von Nickerson *et al.*, 2008, beschriebenen Reinigungsverfahren mit einem dem Propeptid vorgeschalteten N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehen. Aufgrund von Sicherheitsbestimmungen konnte auch lediglich eine nicht-funktionelle Variante von Pseudolysin, Pseudolysin-E141A, kloniert und produziert werden. Dankenswerterweise wurde später aktives Pseudolysin von Dr. Jesko Köhnke vom Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) zur Verfügung gestellt. Die Einführung der DNA-Modifikationen erfolgte analog zu rDAIP über SOE-PCR.

Zur Vermeidung der DAIP-induzierten Autolyse von Bacillolysin und für die nähere Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktion sollte die Protease ebenfalls in einer nicht-funktionellen Form durch Austausch des katalytischen Glu138 gegen Alanin produziert und untersucht werden (Abb. 4.19).



**Abb. 4.19 Struktur des Aktivzentrums von Bacillolysin (Gentilyase).** Das katalytische Glu138 (allgemeine Base/Säure) ist hervorgehoben. Die dargestellte Struktur basiert auf PDB ID 4GER und wurde mit PyMOL 2.0.7 erstellt.



**Abb. 4.20** Klonierungsstrategie für die Herstellung eines Expressionsvektors zur Produktion von nicht-funktionellen M4-Metalloproteasen am Beispiel von *Pro-Bacillolysin-E138A-His<sub>6</sub>*. pMR1 (A) diente zunächst als Matrice für die Amplifikation der Propeptidsequenz unter Verwendung der angegebenen Primer mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* (B). Durch Restriktion von pACYCDuet-1 (C) und dem generierten Amplifikat (B) mit den beiden Restriktionsenzymen (blaue Umrandung) und anschließender Ligation mittels T4-Ligase wurde der Übergangsvektor pACYCDuet-1-npr-Propeptid generiert (D). Im nächsten Schritt wurde über SOE-PCR das katalytische Glu138 innerhalb der codierenden Sequenz des reifen Enzyms gegen Alanin ausgetauscht (E) und das generierte Amplifikat inklusive pelB-Sequenz und C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag nach Restriktion in den mit *NdeI* und *XhoI* (rote Umrandung) präparierten Vektor aus (D) mittels Ligation integriert (F).



Wie in der Einleitung beschrieben, benötigen M4-Metalloproteasen in den meisten Fällen für die korrekte Faltung ihr spezifisches Propeptid, welches als intramolekulares Chaperon fungiert und im Zuge der autokatalytischen Aktivierung über einen komplexen Prozess hydrolysiert wird.

Durch den Aminosäureaustausch des katalytischen Glutamats gegen Alanin bleibt dieser entscheidende Schritt bei der Prozessierung zwangsläufig aus und das Propeptid kovalent mit dem reifen Enzym verbunden. Aus diesem Grund wurden, angelehnt an Yasukawa *et al.*, 2007, die codierenden Sequenzen des Propeptids und des reifen Enzyms in zwei getrennten Polypeptidketten co-exprimiert.<sup>[180]</sup> Hierfür wurde zunächst ausgehend von pMR1 die Propeptid-codierende Sequenz mit der des nativen Signalpeptids sowie den Schnittstellen für *NcoI* und *BamHI* über PCR amplifiziert (Abb. 4.20, A und B) und nach Restriktion über Ligation in den entsprechend linearisierten Vektor pACYC-Duet-1 innerhalb der ersten multiplen Klonierungsstelle (MCS-1) integriert (Abb. 4.20, D).

Die Besonderheit des Vektors besteht in der Co-Expression von zwei getrennten Polypeptidketten *in trans* unter Kontrolle von zwei separaten T7-Promotoren und einem gemeinsamen T7-Terminator. Über SOE-PCR wurde im Folgenden das codierende Triplett für das katalytische Glu138 (GAA) innerhalb der Sequenz des reifen Enzyms gegen ein Alanin-Codon (GCG) ausgetauscht. Zusätzlich wurde das Amplifikat mit den Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *XhoI* sowie jeweils mit den codierenden Sequenzen eines pelB-Signalpeptids und His<sub>6</sub>-Tags am 5'- bzw. 3'-Ende versehen (Abb. 4.20, E).

Das generierte Amplifikat wurde nach Restriktion mit den entsprechenden Enzymen in den linearisierten Vektor in die MCS-2 ligiert (Abb. 4.20, D), woraus der Expressionsvektor pMR5 für die Produktion von *Pro*-Bacillolysin-E138A resultierte (Abb. 4.20, F). Die kursive Schreibweise des Pro-Segments hebt nachfolgend getrennt vorliegende Polypeptidketten einer Protease hervor.

**Tab. 4.4 Relevante Expressionsvektoren zur rekombinanten Produktion von M4-Metalloproteasen und nicht-funktioneller Varianten.** Eine *kursive* Darstellung bedeutet die unabhängige Co-Produktion als eigenständiges Protein.

Gen	Plasmid	Expressionskonstrukt	produziertes Protein	prozessiertes Protein
aur <sub>opt</sub>	pSAA1	Pro-rAureolysin-His <sub>6</sub>	Pro-rAureolysin-His <sub>6</sub>	rAureolysin-His <sub>6</sub>
	pSAA2	His <sub>6</sub> -Pro-rAureolysin-Stop	His <sub>6</sub> -Pro-rAureolysin-Stop	rAureolysin-Stop
	pSAA4	<i>Pro</i> -rAureolysin-E144A-His <sub>6</sub>	Propeptid( <i>aur</i> ) & rAureolysin-E144A-His <sub>6</sub>	rAureolysin-E144A-His <sub>6</sub>
npr	pMR1	Pro-rBacillolysin-His <sub>6</sub>	Pro-rBacillolysin-His <sub>6</sub>	rBacillolysin-His <sub>6</sub>
	pMR5	<i>Pro</i> -rBacillolysin-E138A-His <sub>6</sub>	Propeptid( <i>npr</i> ) & rBacillolysin-E138A-His <sub>6</sub>	rBacillolysin-E138A-His <sub>6</sub>
	pMR7	Propeptid( <i>npr</i> )-His <sub>6</sub>	Propeptid( <i>npr</i> )-His <sub>6</sub>	-
lasB <sub>opt</sub>	pSAP1	<i>Pro</i> -rPseudolysin-E141A-His <sub>6</sub>	Propeptid( <i>lasB</i> ) & rPseudolysin-E141A-His <sub>6</sub>	rPseudolysin-E141A-His <sub>6</sub>
	pSAP2	<i>Pro</i> -rPseudolysin-E141A-Stop	Propeptid( <i>lasB</i> ) & rPseudolysin-E141A-Stop	rPseudolysin-E141A-Stop
nprT <sub>opt</sub>	pSAT1	Pro-rThermolysin-His <sub>6</sub>	Pro-rThermolysin-His <sub>6</sub>	rThermolysin-His <sub>6</sub>
	pSAT2	Pro-rThermolysin-Stop	Pro-rThermolysin-Stop	rThermolysin-Stop
	pSAT3	<i>Pro</i> -rThermolysin-E143A-His <sub>6</sub>	Propeptid( <i>nprT</i> ) & rThermolysin-E143A-His <sub>6</sub>	rThermolysin-E143A-His <sub>6</sub>
	pSAT4	<i>Pro</i> -rThermolysin-E143A-Stop	Propeptid( <i>nprT</i> ) & rThermolysin-E143A-Stop	rThermolysin-E143A-Stop

Die Herstellung der Expressionsvektoren zur Produktion der nicht-funktionellen Proteasen *Pro-rAureolysin-E144A* (pSAA4), *Pro-rPseudolysin-E141A* (pSAP1) und *Pro-rThermolysin-E143A* (pSAT3) erfolgte analog dazu (Tab. 4.4).

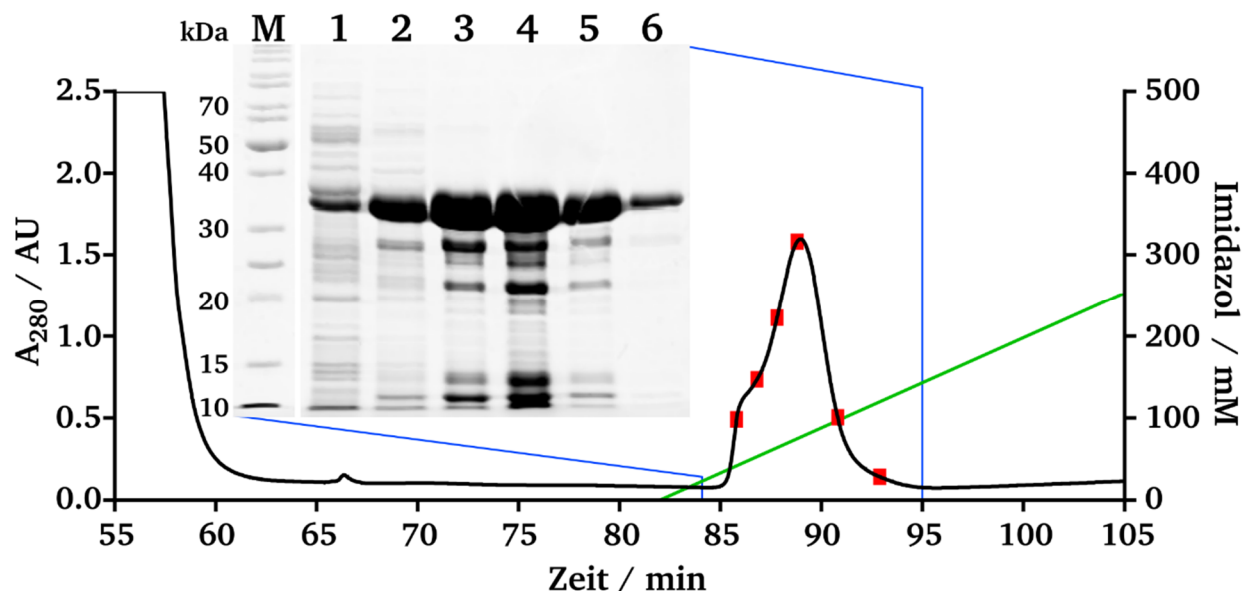
Neben der Produktion und Untersuchung der reifen Enzyme wurde für Inhibitionsstudien und zur Bestimmung der Bindestelle von DAIP zusätzlich das isolierte Propeptid von Bacillolysin kloniert und produziert. Die Integration der codierenden Sequenz erfolgte hier über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Vektor pET22b(+), welcher mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag ausgestattet ist.

Eine Übersicht aller in dieser Arbeit generierten und verwendeten Expressionsvektoren befindet sich in Abschnitt 3.1.6. Die verwendeten DNA-Sequenzen der Gene sowie der Aufbau der einzelnen Konstrukte ist dem Anhang zu entnehmen.

#### 4.2.2. Produktion und Reinigung von M4-Metalloproteasen

##### rBacillolysin-His<sub>6</sub>

Die rekombinante Produktion der proteolytisch aktiven Metalloproteasen, hier exemplarisch am Beispiel von rBacillolysin (pMR1) beschrieben, erfolgte stets in *E. coli* BL21 (DE3) RIL, welcher mittels der entsprechenden Plasmide transformiert wurde. Die Kultivierung und Expression erfolgte im Maßstab von 3x1 L SB-Medium und einer Induktionsdauer von 4 h bei 28 °C. Nach der Zellernte über Zentrifugation wurde das Pellet in Aufschlusspuffer mit CaCl<sub>2</sub> aufgenommen, mit Ultraschall aufgeschlossen und durch erneute Zentrifugation bei 4 °C von Zelltrümmern befreit.

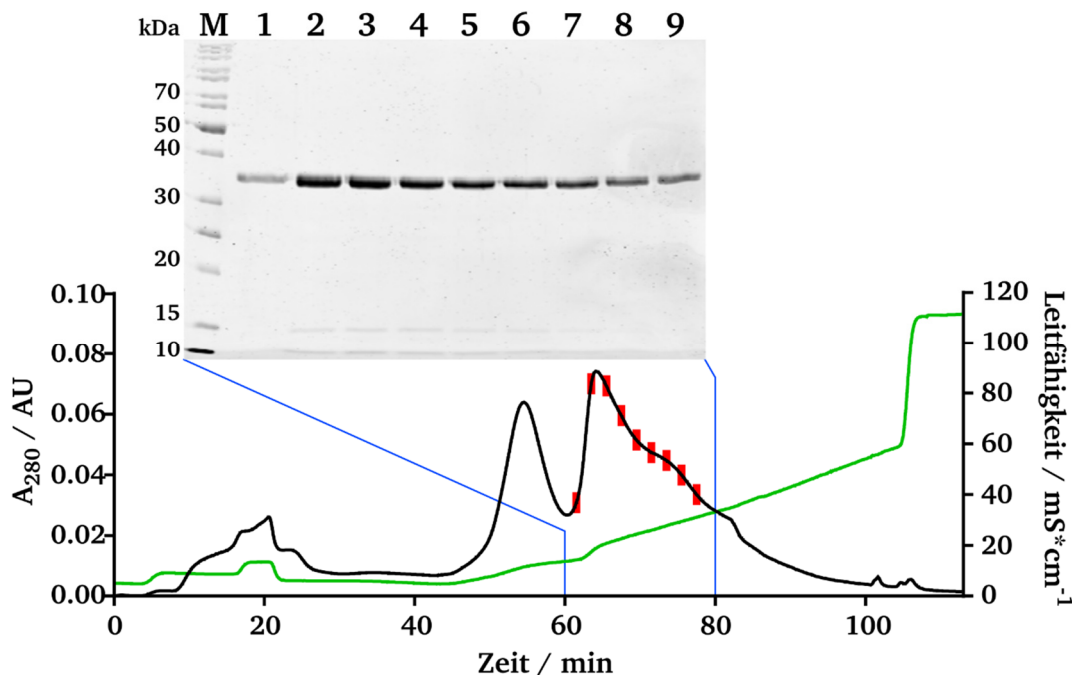


**Abb. 4.21 IMAC-Reinigung des aktiven rBacillolysin-His<sub>6</sub>.** Zur Produktion von rBacillolysin-His<sub>6</sub> wurde der durch pMR1 transformierte Stamm *E. coli* BL12 (DE3) in 3x1 L SB-Medium für 4 h mit 500 µM IPTG bei 28 °C induziert. Das Zellysate in Aufschlusspuffer mit CaCl<sub>2</sub> (3.1.8) wurde mit 1 ml\*min<sup>-1</sup> auf eine mit 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl und 2 mM CaCl<sub>2</sub> äquilibrierte 1-ml-HisTrap HP-Säule gegeben (schwarze Linie). Die gesamte Chromatographie wurde zur Reduktion autolytischer Hydrolyse bei 4 °C durchgeführt. Nach Auftragung und Entfernen unspezifisch gebundener Proteine erfolgte die Elution des Enzyms mit einem linearen Imidazolgradienten von 0-250 mM (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-6, Fraktionen nach 86, 87, 88, 89, 91 und 93 min (rote Balken).



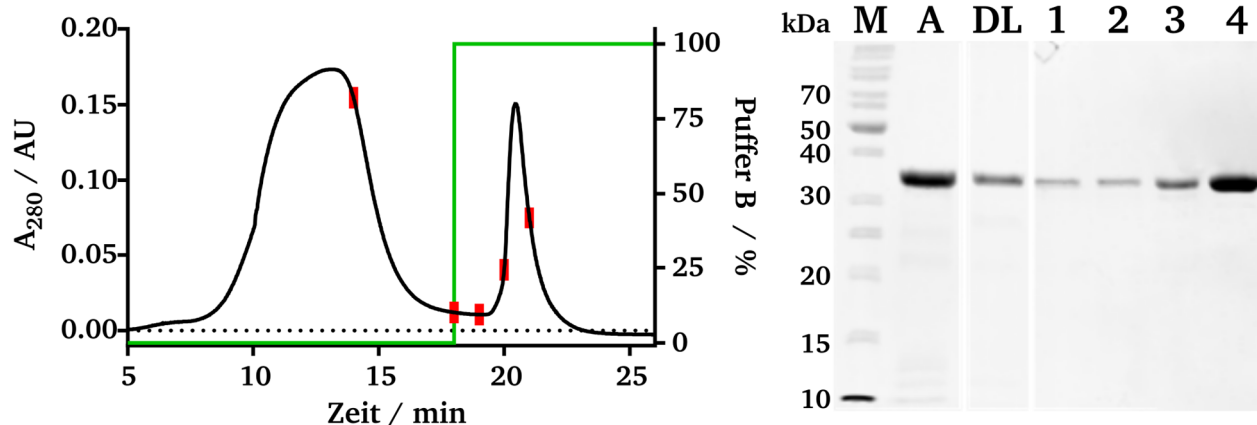
Die im sterilfiltrierten Lysat enthaltenen Proteine wurden anschließend mit einer HisTrap HP-Säule bei 4 °C getrennt. Die Elution des spezifisch gebundenen Enzyms erfolgte über einen linearen Imidazol-Gradienten von 0-250 mM (Abb. 4.21). Bei der Produktion des Vorläuferproteins mit einer Molmasse von 62 kDa erfolgte die autokatalytische Aktivierung umgehend nach der Translokation ins Periplasma, weswegen nur das reife Enzym bei etwa 33 kDa nachgewiesen werden konnte und was zugleich die korrekte Faltung des rekombinanten Enzyms bestätigte. Die Protease wurde zusätzlich nach jedem Reinigungsschritt auf Aktivität über *DabSFans*-Hydrolyse untersucht.

Auch wenn eine komplette Abreicherung kontaminierender Proteine nach der ersten Reinigungsstufe nur selten realisiert werden konnte, war jedoch auffällig, dass neben rBacillolysin fast ausschließlich Proteine mit einer geringeren Molekularmasse über SDS-PAGE nachweisbar waren (Abb. 4.21, Spuren 3-6). Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Proteinbanden hauptsächlich um Abbauprodukte des Enzyms selbst handelte, welche aufgrund der hohen Proteinkonzentration vor bzw. während der Denaturierung entstanden (vgl. Abb. 4.22 und Abb. 4.24).



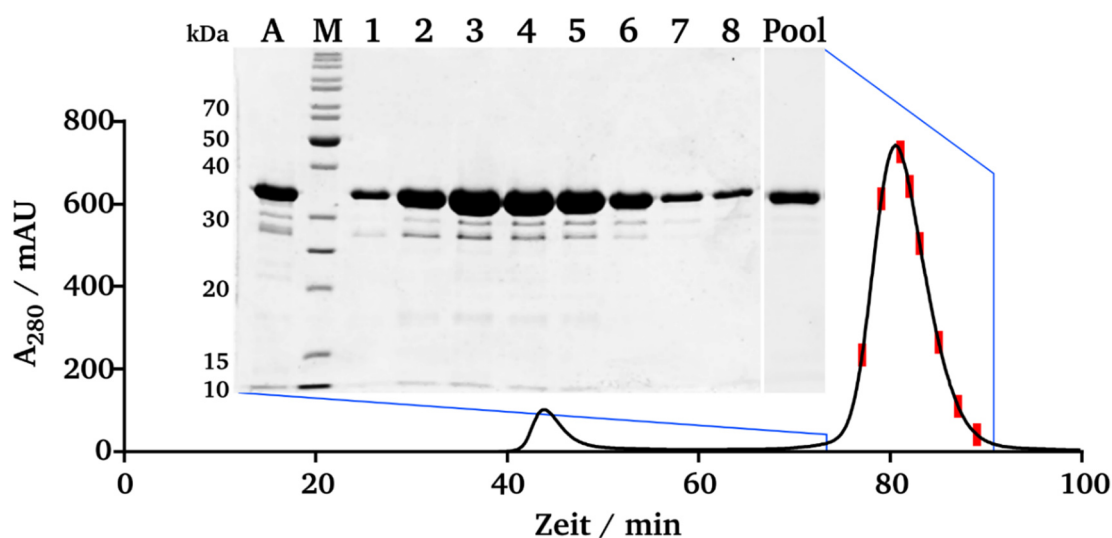
**Abb. 4.22 Anionenaustausch-Chromatographie (AEXC) von rBacillolysin bei pH 8.0.** Die eluierten und vereinigten rBacillolysin-enthaltenden Fraktionen der IMAC aus Abb. 4.21 wurden 1:4 mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt und über 0.2 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt. Die Aufgabe der Probe erfolgte mit  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  auf eine 28-ml-Fractogel EMD TMAE-Säule, die mit 50 mM Tris pH 8.0 und 5 mM  $\text{CaCl}_2$  äquilibriert war (schwarze Linie). Die Elution erfolgte mit linearen Gradienten von 0-0.5 M und 0.5-1 M NaCl (grüne Linie), die Auftrennung und Visualisierung der Proben über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-9, Fraktionen nach 61½, 63½, 65½, 67½, 69½, 71½, 73½, 75½ und 77½ min (rote Balken).

Die vereinigten Fraktionen zwischen 86 min und 95 min wurden anschließend zur weiteren Aufarbeitung mit 0.2 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt, mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt und über eine 28-ml-Fractogel EMD TMAE-Säule bei pH 8.0 getrennt (Abb. 4.22). Durch die verstärkte Autolyseneigung bei hohen Proteasekonzentrationen wurde die Aufarbeitung in den meisten Fällen jeweils mit geringen Enzymmengen durchgeführt. Die Auftrennung und Elution der gebundenen Protease erfolgte über einen linearen NaCl-Gradienten von 0-0.5 M und abschließender Stoßelution mit 1 M.



**Abb. 4.23 Glycyl-D-Phe-Affinitätschromatographie von rBacillolysin nach AEXC.** rBacillolysin wurde mit  $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  auf eine GDF-Säule aufgegeben, die mit 10 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl und 5 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 5.5 äquilibriert war. Nicht-bindende Proteine wurden entfernt und die spezifisch gebundene Protease, durch Erhöhung des pH auf 8.5 über Puffer B, eluiert. Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; A, Auftrag; DL, Durchlauf; 1-4, Fraktionen nach 18, 19, 20 und 21 min (rote Balken).

Durch die hohe Trennleistung der AEXC unter den verwendeten Bedingungen konnte so bereits rBacillolysin mit einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden. Die Elutionsfraktionen der AEXC zwischen 60 min und 84 min wurden im Folgenden vereinigt, mittels Dialyse über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  auf pH 5.5 eingestellt und auf eine Glycyl-D-Phe-Affinitätssäule gegeben (Abb. 4.23), an die nur Thermolysin-ähnliche Proteasen mit funktionaler Tertiärstruktur binden können. Zunächst erweckte das moderate Bindungsverhalten von rBacillolysin, mit einem beträchtlichen Anteil im Durchlauf, den Anschein, dass ein Großteil des reinen Enzyms nicht in nativer Struktur vorlag (Abb. 4.23, Spur DL). Es zeigte sich jedoch in weiteren Untersuchungen, dass kommerzielles Bacillolysin (*Dispase*) ein vergleichbares Bindeverhalten aufwies und nur die Bindungsaffinität geringer war als bei Thermolysin.



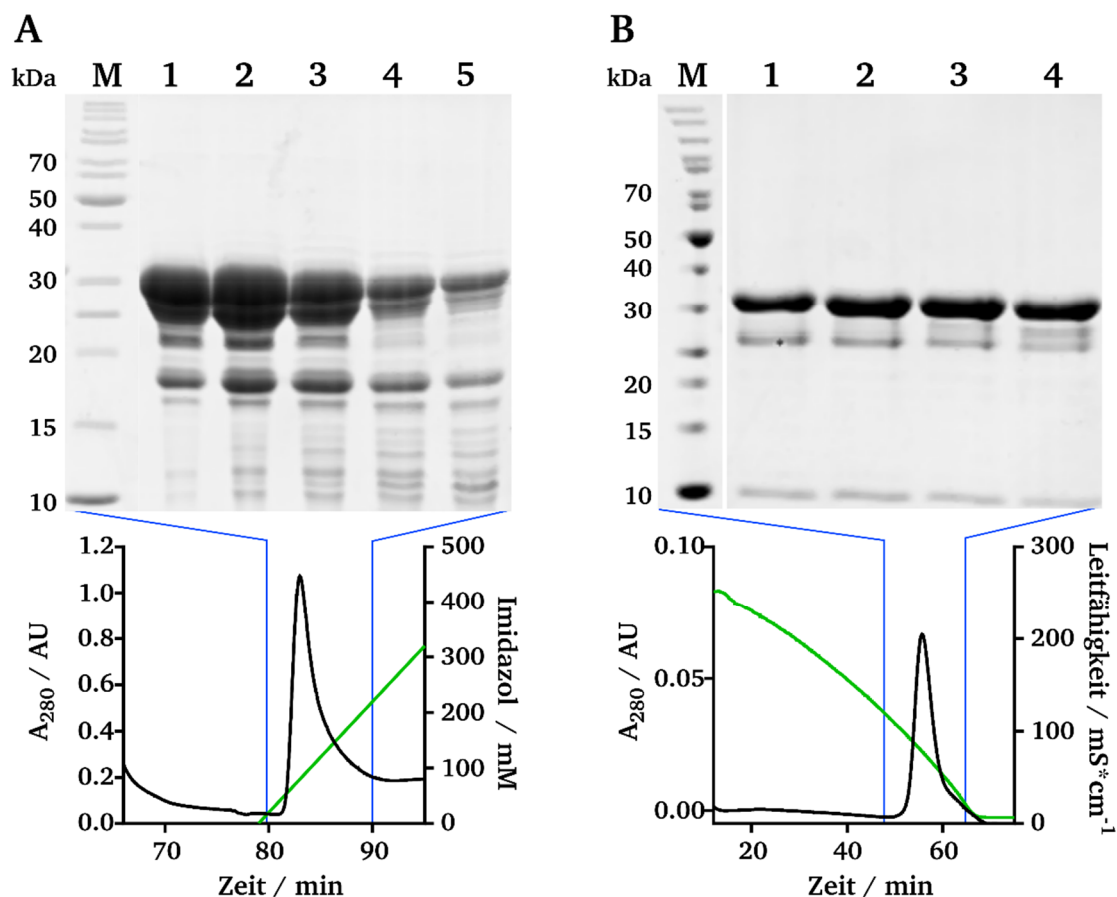
**Abb. 4.24 Endreinigung von rBacillolysin über Superdex75-Gelpermeationschromatographie bei pH 8.0.** Die abschließende Reinigung und Umpufferung von rBacillolysin erfolgte auf einer Superdex75 16/600 pg bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  in 50 mM Tris pH 8.0 mit 300 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (schwarze Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-8, Fraktionen nach 77, 79, 81, 82, 83, 85, 87 und 89 min (rote Balken).

Die Abtrennung von denaturiertem Enzym und die Gewinnung hoher Ausbeuten erforderten die wiederholte Aufgabe des Durchlaufs, wie die Aktivitätsbestimmung der jeweiligen Durchlaufaktionen

zeigte (nicht dargestellt). Das spezifisch gebundene Enzym wurde nach der Freisetzung vereinigt und unter mehrmaligem Pufferwechsel ü.N. bei 4 °C dialysiert. Die Endreinigung der Protease erfolgte über Superdex75-GPC bei pH 8.0 und 4 °C. (Abb. 4.24). Die Fraktionen mit reinem rBacilolysin nach 75 min bis 91 min und einem Maximum nach 81.1 min wurden vereinigt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Durch das verwendete Verfahren waren so in der Regel Ausbeuten an reinem Enzym von bis zu 10 mg pro Liter Kulturbrohe möglich.

### Propeptid(*npr*)-His<sub>6</sub>

Für Inhibitionsstudien und zur näheren Charakterisierung der DAIP-Bindestelle wurde neben aktivem rBacilolysin auch das inhibitorische Propeptid(*npr*) mit pMR7 transformiertem *E. coli* BL21 (DE3) über 4 h bei 28 °C produziert. Die Aufarbeitung des über Ultraschallaufschluss erhaltenen Zellysats erfolgte wie beschrieben über IMAC mit einem linearen Imidazolgradienten (Abb. 4.25, A).



**Abb. 4.25** Reinigung von Propeptid(*npr*)-His<sub>6</sub> über IMAC (His-Trap HP) und HIC (Phenyl-Sepharose) bei pH 7.5. A, Zur Produktion von Propeptid(*npr*)-His<sub>6</sub> wurden die pMR7-tragenden *E. coli* BL12 (DE3)-Zellen in 3x1 L SB-Medium für 4 h mit 500 µM IPTG bei 28 °C induziert. Das Zellysats in Aufschlusspuffer (3.1.8) wurde mit 1 ml·min<sup>-1</sup> auf eine mit 50 mM Tris pH 7.5 und 150 mM NaCl äquilibrierte 1-ml-HisTrap HP-Säule gegeben (schwarze Linie), nicht-bindende Proteine entfernt und das Propeptid(*npr*) mittels Imidazolgradienten eluiert (grüne Linie). B, Die Probenaufgabe der vereinigten Fraktionen aus A zwischen 80 min und 90 min auf eine 11-ml-Phenyl-Sepharose-Säule erfolgte bei pH 7.5 und 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (schwarze Linie). Die Elution der gebundenen Proteine verlief über einen linearen Gradienten von 1.5-0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren A: M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-5, Fraktionen zwischen 82 und 90 min. Spuren B: 1-4, Fraktionen zwischen 53 und 61 min.

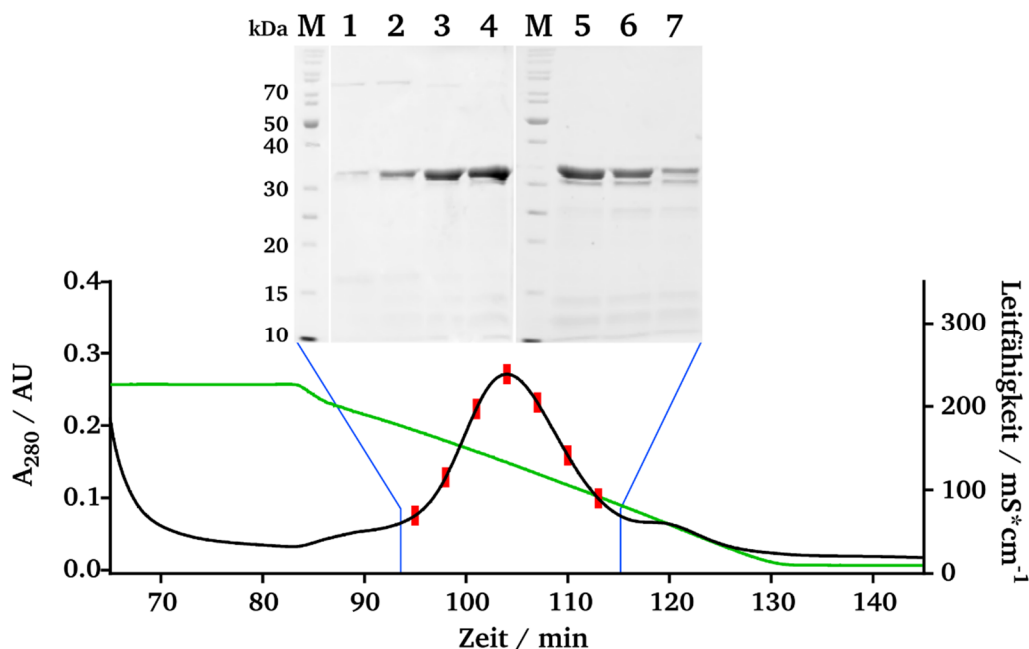
Dabei zeigte Propeptid(*npr*), entgegen der erwarteten 28.7 kDa, eine apparente Molekülmasse von etwa 31 kDa. Zusätzlich war eine Vielzahl an Propeptid-Fragmenten zu erkennen, was bereits auf

hydrolytischen Abbau durch intrinsische *E. coli*-Proteasen hindeutete, der im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch eine Rolle spielte.

Die vereinigten Fraktionen zwischen 80 min und 90 min (Abb. 4.25, A) wurden anschließend nach Zugabe von 1.5 M Ammoniumsulfat über HIC aufgetrennt (Abb. 4.25, B). Die späte Elution von Propeptid(*npr*) bei etwa  $100 \text{ ms} \cdot \text{cm}^{-1}$  zeigte den hydrophoben Charakter des Proteins. Die verbleibenden Banden wurden vermutlich von Abbauprodukten des Propeptids verursacht, welche, aufgrund ähnlicher Eigenschaften, nicht weiter abgetrennt werden konnten.

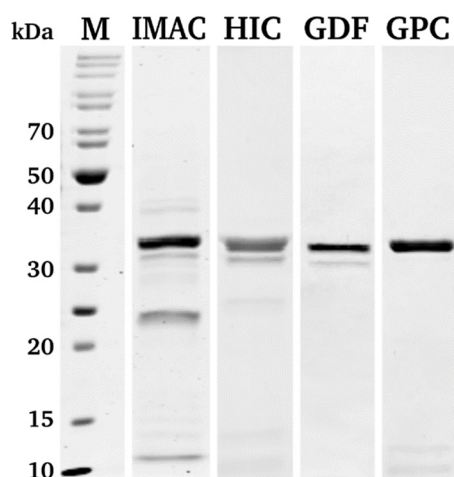
### rThermolysin-His<sub>6</sub>

Die Produktion von rThermolysin-His<sub>6</sub> erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) und dem Vektor pSAT1 in SB-Medium für 2 h bei 28 °C mit 500  $\mu\text{M}$  IPTG (vgl. Tab. 4.4). Die kurze Induktionsdauer war der offensichtlich zytotoxischen Wirkung der Überexpression des optimierten *nprT*-Gens geschuldet.



**Abb. 4.26 Hydrophobe Interaktionschromatographie von rThermolysin-His<sub>6</sub> mit Phenyl-Sepharose bei pH 7.5.** Zur Aufgabe wurde die Probe zunächst auf eine Endkonzentration von 2.5 M NaCl eingestellt. Der Auftrag auf eine entsprechend äquilibrierte 11-ml-Phenyl-Sepharose-Säule erfolgte mit  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  bei pH 7.5 (schwarze Linie). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen NaCl-Gradienten von 2.5-0 M (grüne Linie), die Auftrennung und Visualisierung erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-7, Fraktionen nach 95, 98, 101, 104, 107, 110 und 113 min (rote Balken).

Nach Isolation des Enzyms über IMAC erfolgte jedoch im Gegensatz zu rBacilloolysin die weitere Aufarbeitung über HIC mit 2.5 M NaCl, da Thermolysin unter den gewählten Bedingungen weder an das Anionenaustauscher-Material TMAE noch DEAE bei pH 8 adsorbierte (Abb. 4.26). Die abschließende Reinigung der vereinigten Fraktionen zwischen 95 min und 113 min erfolgte analog zu rBacilloolysin über GDF-Chromatographie und GPC (Abb. 4.27). Durch die stärkere Bindung von Thermolysin an das immobilisierte, D-Phenylalanin-enhaltene Pseudosubstrat war der Zeitaufwand für die Affinitätschromatographie gegenüber rBacilloolysin deutlich geringer. Abschließend wurde das Enzym aliquotiert und bei -80 °C gelagert.



**Abb. 4.27 Übersicht der Aufarbeitung von rThermolysin mit His<sub>6</sub>-Tag.** Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; IMAC, Vereinigte Fraktionen von rThermolysin-His<sub>6</sub> nach Isolation über IMAC mit linearem Imidazolgradienten von 0-500 mM bei pH 7.5. Die Produktion erfolgte in mit pSAT1-transformierten *E. coli* BL12 (DE3) für 2 h mit 500 µM IPTG bei 28 °C; HIC, Vereinigte rThermolysin-Fraktionen nach HIC mit linearem NaCl-Gradienten von 2.5-0 M pH 7.5 (vgl. Abb. 4.26); GDF, Gly-DPhe-Fraktionen von rThermolysin nach Elution durch pH-Erhöhung von 5.5 auf 8.5 analog zu rBacilloolysin (vgl. Abb. 4.23); GPC, Endprodukt der Reinigung von rThermolysin nach GPC über Superdex75 unter den in Abb. 4.24 für rBacilloolysin beschriebenen Bedingungen.

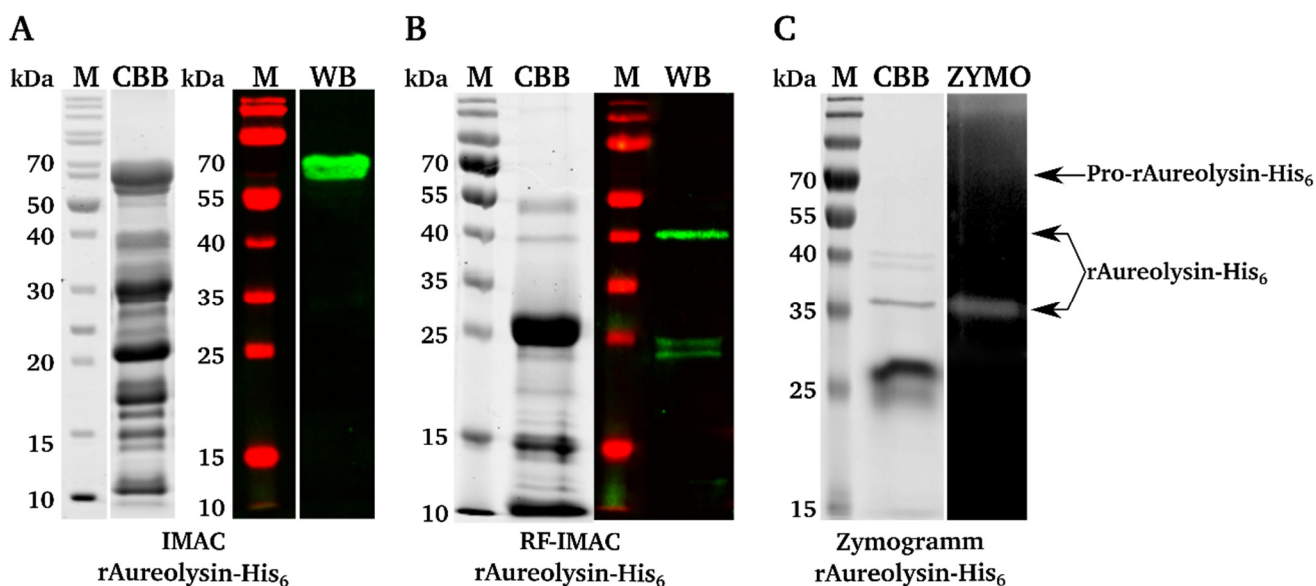
Bei der Aufarbeitung von rThermolysin-His<sub>6</sub> zeigte sich zudem eine Besonderheit, die auf die verwendete *Xho*I-Restriktionsschnittstelle, deren Nukleotidsequenz die Aminosäuren Leucin und Glutamat codiert, verweist. Im Verlauf der Reinigung bzw. durch längere Lagerung war ein Verlust des His<sub>6</sub>-Tags zu beobachten, welcher aufgrund der Substratspezifität des Enzyms wahrscheinlich auf die autokatalytische Hydrolyse der Peptidbindung vor dem LE-Motiv zurückzuführen war (Abb. 7.3).

Neben rThermolysin-His<sub>6</sub> wurde unter den gleichen Bedingungen zusätzlich eine Tag-freie Variante des Enzyms durch Expression von pSAT2 in *E. coli* BL21 (DE3) produziert (vgl. Tab. 4.4). Die hohe Hitzestabilität und proteolytische Aktivität des Enzyms erleichterte dabei die Aufarbeitung. Das zellfreie Lysat wurde zunächst für 3 h bei 50 °C inkubiert, präzipitiertes Protein über Zentrifugation abgetrennt und die im Überstand verbliebenen Proteine inklusive rThermolysin über HIC wie zuvor aufgetrennt. Das weitere Reinigungsprotokoll erfolgte wie für die His<sub>6</sub>-getagte Variante beschrieben über GDF-Chromatographie und GPC.

### rAureolysin-His<sub>6</sub> & His<sub>6</sub>-Pro-rAureolysin

Die Produktion von rAureolysin mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag erfolgte zunächst analog zu rBacilloolysin in *E. coli* BL21 (DE3) RIL mit dem Vektor pSAA1 für 4 h bei 28 °C und 500 µM IPTG. Nach Zellaufschluss und Auftrennung über IMAC war neben einer Vielzahl kontaminierender Proteine jedoch nur das inaktive Proenzym mit einer apparenten Masse von etwa 60 kDa über SDS-PAGE, anti-His-Western Blot (Abb. 4.28, A) sowie *Dab*SFans-Hydrolyse nachweisbar (nicht dargestellt). In Anlehnung an Nickerson *et al.*, 2008, wurde daraufhin der Versuch unternommen, das inaktive, wahrscheinlich fehlgefaltete Proenzym durch Denaturierung mit 6 M Harnstoff und langsamen Entzug der chaotropen Verbindung zu falten. <sup>[224]</sup>

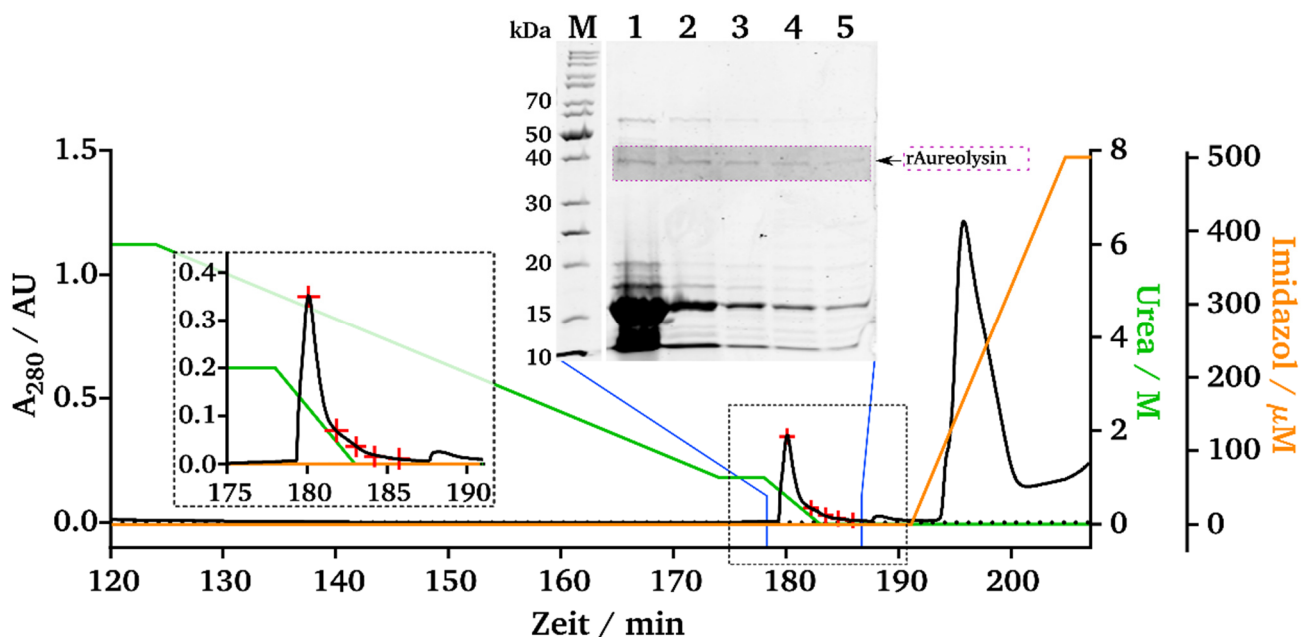




**Abb. 4.28 Produktion, Isolation und Rückfaltung von aktivem rAureolysin-His<sub>6</sub>.** Zur Produktion von rAureolysin-His<sub>6</sub> wurden die pSAA1-tragenden *E. coli* BL12 (DE3) RIL-Zellen in 3x1 L SB-Medium für 4 h mit 500  $\mu$ M IPTG bei 28 °C induziert. Das Zelllysate in Aufschlusspuffer (3.1.8) wurde analog zu rBacillolysin nach Entfernung unspezifisch bindender Proteine mittels IMAC aufgetrennt. A, CBB- und immunchemische Färbung der vereinigten IMAC-Fractionen nach Imidazol-Elution mit polyklonalem anti-His IgG nach Western Blot (WB). B, CBB- und immunchemische Färbung der vereinigten durch Imidazol eluierten Proteinrückfaltungs (RF)-IMAC-Fractionen nach Renaturierung über zwei lineare Gradienten von 6-1 M und 1-0 M Harnstoff mit polyklonalem anti-His IgG nach Western Blot. C, CBB-Färbung und Zymogramm (ZYMO) des rückgefalteten rAureolysin-His<sub>6</sub> nach RF-IMAC.

Die Renaturierung erfolgte dabei durch HisTrap-Immobilisierung der Protease über deren C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag und zwei linear absteigende Gradienten, die den Harnstoff von 6 M auf 1 M und 1 M auf 0 M reduzierten. Das aktive Enzym wurde abschließend über einen Imidazolgradienten eluiert und mittels immunchemischer Färbung nachgewiesen (Abb. 4.28, B). Aktives rAureolysin-His<sub>6</sub> konnte so mit einer von 33.2 kDa abweichenden apparenten Masse bei etwa 40 kDa nachgewiesen werden, welches sich mit dem in der Literatur beschriebenen Laufverhalten deckte. Dass es sich bei der immunchemisch gefärbten Bande wirklich um das aktive Enzym handelte, konnte durch *DabSFans*-Hydrolyse und, wie in 3.5.6 beschrieben, durch eine ungefärbte Bande auf entsprechender Höhe in einem Zymogramm bestätigt werden (Abb. 4.28, C). Das beobachtete Laufverhalten bei etwa 36 kDa innerhalb des Zymogramms resultierte maßgeblich aus der vergleichsweise langen Laufdauer der Proben während der Elektrophorese.

Nachteile dieses Verfahrens waren der sehr geringe Anteil an nativem Enzym, welches erst durch Rückfaltung die aktive Konformation erhielt, und ein vergleichsweise hohes Maß an Verunreinigungen nach der Imidazol-Elution. Im Folgenden wurden daher die Produktionsbedingungen durch Umstellung auf Autoinduktions-Medium angepasst. Zudem wurde rAureolysin durch Expression von pSAA2 mit einem dem Propeptid N-terminal vorgeschalteten His<sub>6</sub>-Tag produziert (s. Tab. 4.4). Der Ultraschall-Aufschluss erfolgte nach Zellernte in Anwesenheit von 6 M Harnstoff. Das sterilfiltrierte Zelllysate wurde anschließend wie zuvor auf eine HisTrap-HP-Säule gegeben, über zwei sukzessive lineare Gradienten von 6-1 M und 1-0 M Harnstoff gefaltet und, im Gegensatz zu pSAA1, dabei direkt eluiert.



**Abb. 4.29 RF-IMAC von His<sub>6</sub>-Pro-rAureolysin bei pH 7.5 und 6 M Harnstoff.** Die Produktion von rAureolysin erfolgte im pSAA2-transformiertem *E. coli* BL12 (DE3) RIL in 6x1 L Autoinduktions-Medium für 22 h bei 28 °C. Das Zelllysate wurde in Anwesenheit von 6 M Harnstoff mit 5 ml\*min<sup>-1</sup> auf eine entsprechend äquilibrierte 5-ml-HisTrap HP-Säule gegeben (schwarze Linie). Nach Entfernung unspezifisch bindender Proteine erfolgten zwei sukzessive lineare Harnstoff-Gradienten von 6-1 M über 50 min und 1-0 M über 15 min bei 3 ml\*min<sup>-1</sup> (grüne Linie) zur Elution des korrekt gefalteten aktiven Enzyms (hervorgehoben, lila Rahmen in SDS-PA-Gel). Die abschließende Elution gebundener Propeptid-Fragmente und ungefalteten Proenzym erfolgte zwischen 0-500 mM Imidazol (orange Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-5, Fraktionen bei 180, 182, 183.3, 184.3, und 185.6 min (rote Balken, links: vergrößerter gestrichelt umrandeter Chromatogramm-Ausschnitt).

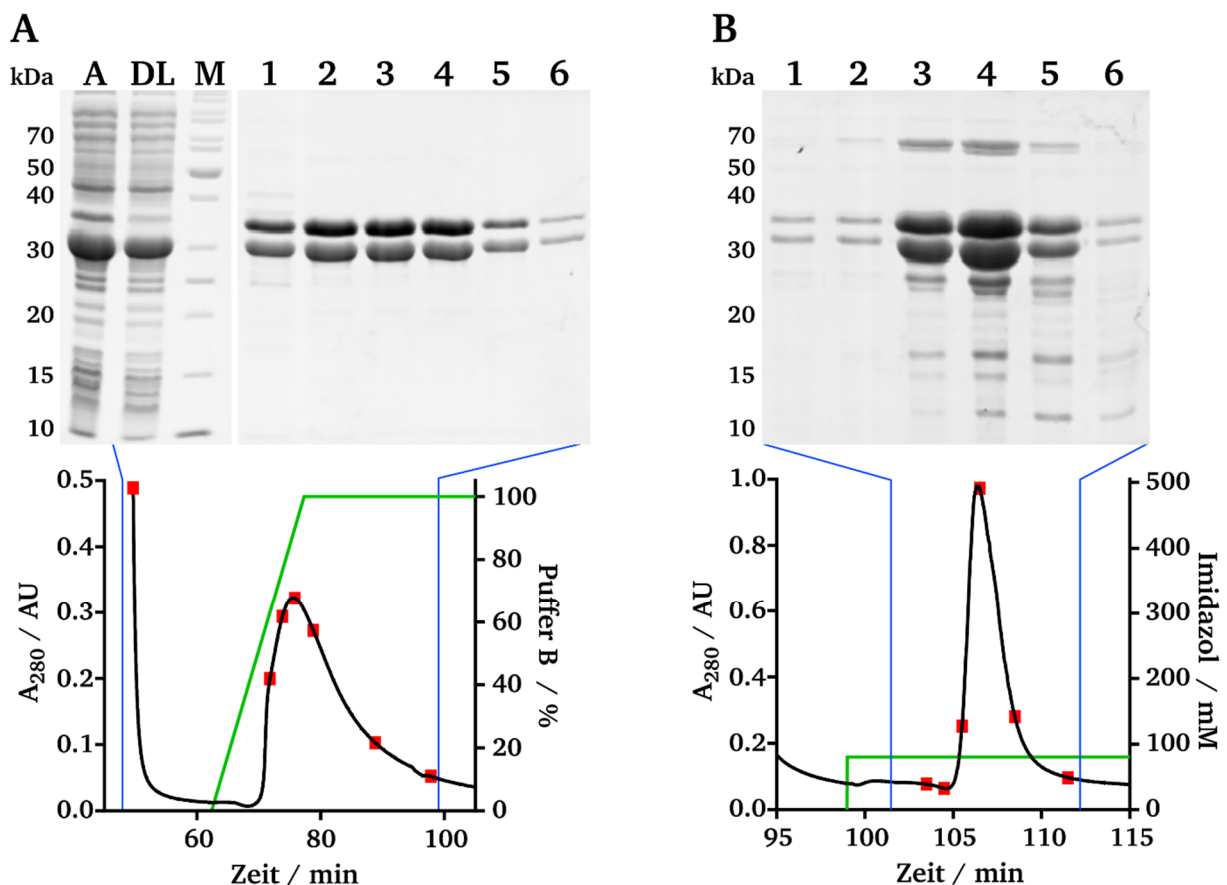
Durch die N-terminale Immobilisierung spaltete sich das aktive Enzym direkt vom Propeptid ab, wodurch es ohne Imidazol bei einer Harnstoffkonzentration von etwa 0.7 M von der Säule eluierte (Abb. 4.29). Aktives, nicht-getagtes rAureolysin wies wie rAureolysin-His<sub>6</sub> eine apparente Masse von etwa 40 kDa auf und besaß ebenfalls proteolytische Aktivität. Die Ausbeute blieb jedoch trotz weiterer Optimierungsversuche sehr gering. Zudem enthielten die Elutionsfraktionen einen großen Anteil an Verunreinigungen, welche wahrscheinlich aus Abbauprodukten des Proenzym durch die geringe Menge an hochaktivem rAureolysin resultierten. Diese Annahme wurde durch die bei der RF-IMAC von C-terminal immobilisiertem Pro-rAureolysin-His<sub>6</sub> ausbleibende Elution kontaminierender Proteine und Fragmente während der Rückfaltung gestützt (nicht dargestellt). Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht mehr möglich die Produktion und Reinigung des Enzyms weiter zu optimieren. Die vereinigten Fraktionen zwischen 179 min und 186 min wurden abschließend mit Aceton gefällt, mittels AEXC über DEAE-Sephadex stoßeluiert und bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.3. Produktion, Reinigung und Prozessierung nicht-funktioneller M4-Metalloproteasen

Die Untersuchung zur Ermittlung des DAIP-Mechanismus erforderte im Rahmen dieser Arbeit auch die Produktion nicht-funktioneller Varianten von Metalloproteasen. Dazu musste jedoch das Propeptid der durch Austausch des katalytischen Glutamats gegen Alanin inaktivierten Proteasen entfernt werden. Da



die Aufarbeitung der nicht-funktionellen Enzyme in weiten Teilen vergleichbar war, soll im Folgenden das Verfahren am Beispiel von *Pro-rBacilloylsin-E138A* näher dargestellt werden. Das nicht-funktionelle Enzym, bestehend aus Propeptid und reifer Domäne, wurde mit pMR5-transformiertem *E. coli* BL21 (DE3) in SB-Medium mit 10  $\mu$ M IPTG für 16 h bei 28 °C als zwei getrennte Polypeptidketten produziert. Das nach Zellaufschluss erhaltene Lysat wurde anschließend auf eine HisTrap HP-Säule aufgegeben, und zunächst unspezifisch gebundene Proteine eluiert. Die spezifische Elution des gebundenen Zielprotein-Komplexes aus rBacilloylsin-E138A (E138A) und seinem hochaffinen inhibitorischen Propeptid erfolgte zum einen durch Verdrängung mit 80 mM Imidazol (Abb. 4.30, B) oder aber durch Erhöhung der Azidität mit einem pH 4.8-Puffer (Abb. 4.30, A).

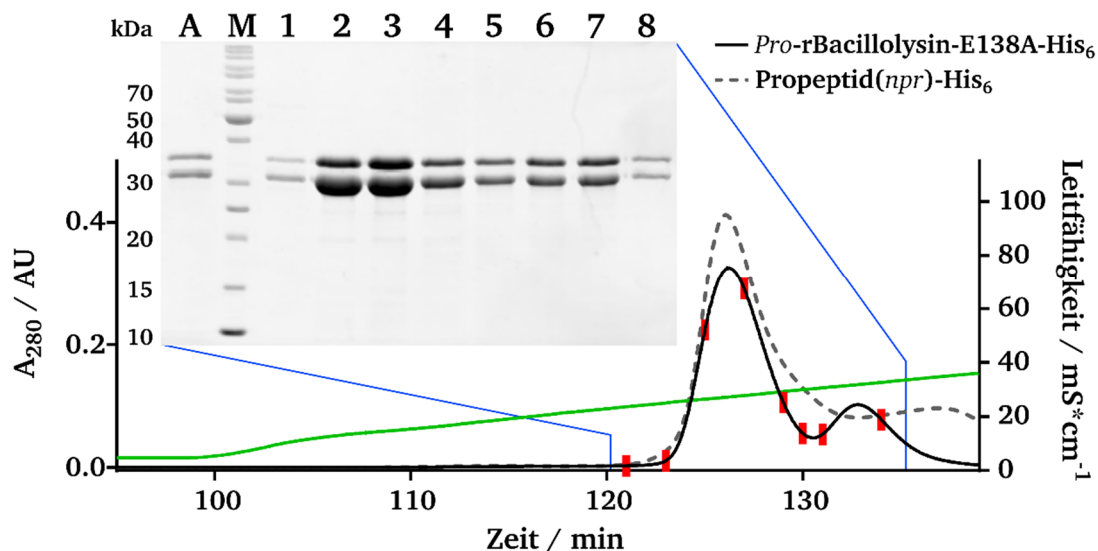


**Abb. 4.30 IMAC-Reinigung des nicht-funktionellen rBacilloylsin-E138A-Proenzymes über (A) Imidazol- und (B) pH-Elution.** Die Produktion von *Pro-rBacilloylsin-E138A-His<sub>6</sub>* erfolgte als nicht-kovalent verbundener Proenzymkomplex durch Induktion von pMR5-transformiertem *E. coli* BL21 (DE3) mit 10  $\mu$ M IPTG in 3x1 L SB-Medium für 16 h bei 28 °C. Das Zellysate in Aufschlusspuffer mit  $\text{CaCl}_2$  (3.1.8) wurde mit 1 ml\*min<sup>-1</sup> auf eine mit 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  äquilibrierte 1-ml-HisTrap HP-Säule gegeben (schwarze Linie). Nach Auftragung und Entfernen unspezifisch gebundener Proteine erfolgte die Elution des Proenzym-Komplexes entweder durch (A) pH-Absenkung mit 100 mM Na-Acetat pH 4.8 (Puffer B) oder (B) isokratische Verdrängung mit 80 mM Imidazol (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren A: A, Auftrag; DL, Durchlauf; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-6, Fraktionen nach 72, 74, 76, 79, 89 und 98 min (rote Balken). Spuren B: 1-6, Fraktionen nach 103½, 104½, 105½, 106½, 108½ und 111½ min (rote Balken).

Zunächst zeigte sich im Auftrag und der Durchlaufraktion (Abb. 4.30, Spur A und DL), dass im Vergleich zum reifen Enzym ein hoher Überschuss an Propeptid produziert wurde. Dieser konnte jedoch mangels His<sub>6</sub>-Tags größtenteils abgetrennt werden. Aufgrund der unabhängigen Produktion von Propeptid und reifem rBacilloylsin-E138A sowie der propeptidabhängigen Faltung der Protease blieb wahrscheinlich

ein Teil des reifen Enzyms ungefaltet und wurde in Folge dessen von *E. coli*-Proteasen abgebaut, woraus der Propeptid-Überschuss resultierte. Die Isolation des Komplexes aus nicht-funktionellem Enzym und Propeptid konnte aber jeweils durch pH- wie auch Imidazol-Elution durchgeführt werden. Jedoch verblieb, wahrscheinlich aufgrund des relativ hydrophoben Charakters (vgl. Abb. 4.25, B), im Falle der Imidazol-Elution ein leichter Überschuss des Propeptids adsorptiv am reifen Enzym gebunden.

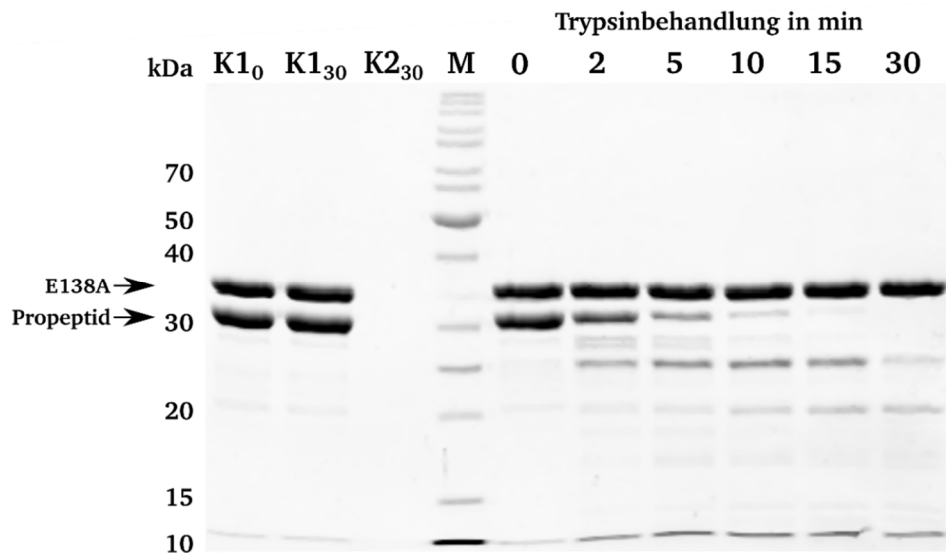
Die weitere Aufarbeitung und Umpufferung nach Vereinigung und Verdünnung der Zielprotein-enthaltenden Fraktionen erfolgte über AEX mit linearem NaCl-Gradienten bei pH 8.0 (Abb. 4.31). Dabei zeigte sich ein zunächst ungewöhnliches Elutionsverhalten des Pro-Enzym-Komplexes bei zwei unterschiedlichen Leitfähigkeiten von  $27.7 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  und  $32.1 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Die Überlagerung des Chromatogramms mit einer analog durchgeführten Chromatographie des eigenständig produzierten Propeptid(*npr*)-His<sub>6</sub> legte die Vermutung nahe, dass der Komplex aus zwei Proteinen im ersten Peak (Abb. 4.31, Spuren 1-5) mit der Propeptidseite und im zweiten Peak mit der Enzym-Seite (Abb. 4.31, Spuren 6-8) an das Trägermaterial gebunden war. So erklärte sich auch der im Vergleich zum zweiten Peak minimale Unterschuss an Enzym zum Propeptid. Zur Untersuchung der DAIP-Interaktion mit rBacilolysin-E138A musste das Propeptid zunächst abgetrennt werden. Es zeigte sich jedoch, dass das reife Enzym und sein Propeptid eine so hohe Affinität besaßen, dass eine Trennung weder durch Chromatographie (IMAC, IEX, HIC, GDF, GPC) noch fraktionierende Fällung (Aceton, Ethanol, Ammoniumsulfat) oder partielle Denaturierung (SDS, Harnstoff, Guanidiumhydrochlorid) möglich war.



**Abb. 4.31** Anionenaustausch-Chromatographie (AEXC) des rBacilolysin-E138A-Proenzym-Komplexes bei pH 8.0. Die vereinigten rBacilolysin-E138A-enthaltenden Fraktionen nach IMAC (Abb. 4.30) wurden 1:4 mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 0.2 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt. Die Aufgabe der Probe erfolgte mit  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  auf eine 28-ml-*Fractogel* EMD TMAE-Säule, die mit 50 mM Tris pH 8.0 und 5 mM CaCl<sub>2</sub> äquilibriert wurde (schwarze Linie). Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0-0.5 M NaCl (grüne Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-8, Fraktionen nach 121, 123, 125, 127, 129, 130, 131 und 134 min (rote Balken).

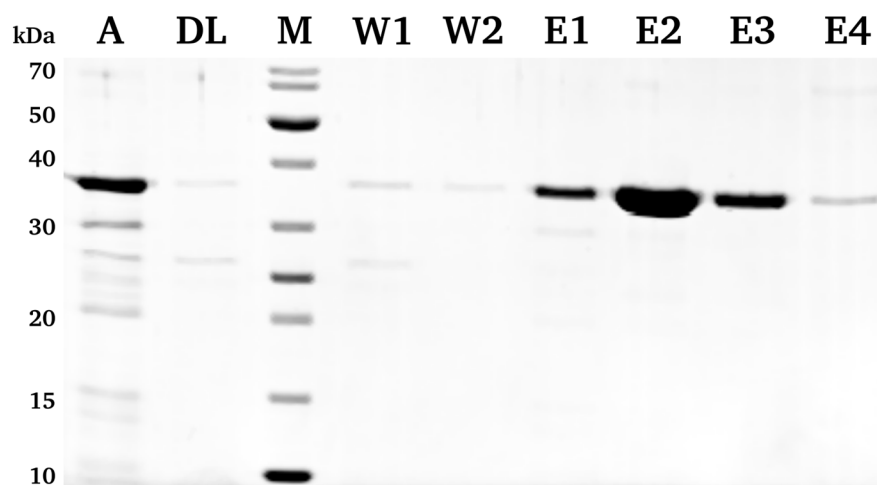
Letztlich erwies sich der proteolytische Abbau des Propeptids über eine extern zugeführte Protease als einzige Möglichkeit zur Erzielung eines Propeptid-freien Proteins. Die präparative Prozessierung des Pro-Enzym-Komplexes durch Hydrolyse des Propeptids erfolgte, abhängig von der Gesamtproteinmenge,

mit immobilisiertem Trypsin (EC 3.4.21.4) in einem molaren E/S-Verhältnis von 1:20,000 für 16 h bei 30 °C. Zur zeitlichen Auflösung und besseren Darstellung wurde der Abbau mit nicht-immobilisiertem Trypsin über 30 min im molaren E/S-Verhältnis von 1:300 untersucht (Abb. 4.32). Durch kontinuierliche Abnahme der Propeptidbande bei etwa 31 kDa konnte gezeigt werden, dass Trypsin innerhalb des untersuchten Zeitraums das gebundene Propeptid von E138A vollständig abbaute.



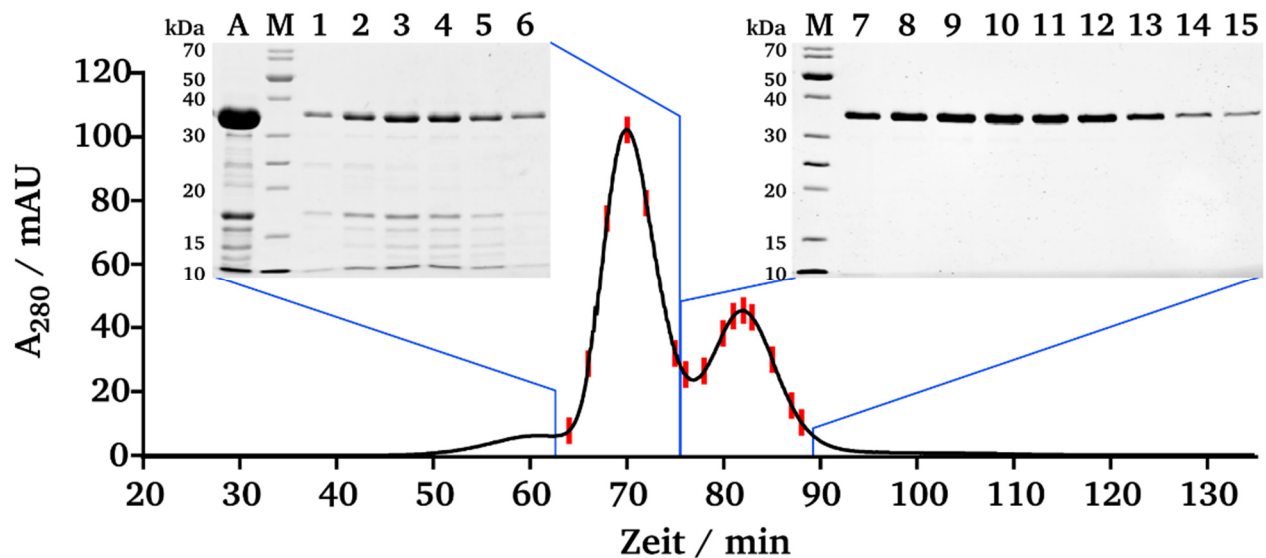
**Abb. 4.32** Prozessierung von *Pro-rBacillolysin-E138A* zu *rBacillolysin-E138A* mittels Propeptid-Hydrolyse durch Trypsin bei 30 °C. Die analytische Entfernung des Propeptids von 15 µM *Pro-rBacillolysin-E138A* erfolgte durch Inkubation für 30 min bei 30 °C mit 0.05 µM Trypsin. Als Kontrollen wurde jeweils *Pro-rBacillolysin-E138A* (K1) und Trypsin in den entsprechenden Konzentrationen (K2) mitgeführt. Die Hydrolyse wurde zu den angegebenen Zeiten durch Denaturierung bei 95 °C beendet und die Proben über SDS-PAGE (12.5%) aufgetrennt und CBB-gefärbt. Spuren: K1<sub>0</sub>, *Pro-rBacillolysin-E138A* nach 0 min; K1<sub>30</sub>, *Pro-rBacillolysin-E138A* nach 30 min; K2<sub>30</sub>, Trypsin nach 30 min; 0-30, Reaktionsansatz nach 0, 2, 5, 10, 15 und 30 min.

Eine Hydrolyse des reifen Enzyms bei etwa 33 kDa konnte hingegen selbst bei einer Inkubationsdauer von bis zu 48 h nicht beobachtet werden. Nach Trypsinbehandlung lag so das Propeptid-freie, reife *rBacillolysin-E138A* vor, welches anschließend zur Entfernung der entstandenen Abbauprodukte über IMAC und GDF-Chromatographie aufgearbeitet wurde (Abb. 4.33).



**Abb. 4.33** Gly-DPhe-Affinitätschromatographie von reifem *rBacillolysin-E138A* nach Propeptid-Hydrolyse. *rBacillolysin-E138A* wurde bei pH 5.5 auf eine 2-ml-GDF-Tropfsäule aufgegeben, die zuvor mit 10 mM Na-Acetat pH 5.5, 150 mM NaCl und 5 mM CaCl<sub>2</sub> äquilibriert war. Nicht-bindende Proteine wurden entfernt und die spezifisch gebundene Protease durch Erhöhung des pH auf 8.5 in 2-ml-Fractionen eluiert. Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: A, Auftrag; DL, Durchlauf; M, Molekulargewichtsmarkermischung; W1+W2, Waschfraktionen; E1-E4, Elutionsfraktionen.

Trotz der geringen eingesetzten Menge an freiem oder immobilisiertem Trypsin, verblieb stets ein gewisser Anteil davon, welcher nicht vollständig abgetrennt werden konnte, im gereinigten Produkt. Über die spezifische Bindung und Elution des nicht-funktionellen Enzyms in den Fraktionen E1 bis E4 der GDF-Chromatographie konnte zudem eine strukturelle Beeinträchtigung durch die Propeptidhydrolyse bzw. vorangegangenen Reinigungsschritte ausgeschlossen werden. Die Endreinigung von rBacillolysin-E138A erfolgte über Superdex75-Gelpermeationschromatographie analog zu rBacillolysin bei pH 8.0 (Abb. 4.34, vgl. Abb. 4.24).



**Abb. 4.34** Endreinigung von rBacillolysin-E138A über S75-Gelpermeationschromatographie bei pH 8.0. Die abschließende Reinigung von rBacillolysin-E138A erfolgte auf einer Superdex75 16/600 pg bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  in 50 mM Tris pH 8.0 mit 300 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (schwarze Linie). Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. Spuren: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; 1-15, Fraktionen nach 64, 66, 68, 70, 72, 75, 76, 78, 80, 81, 82, 83, 85, 87 und 88 min (rote Balken).

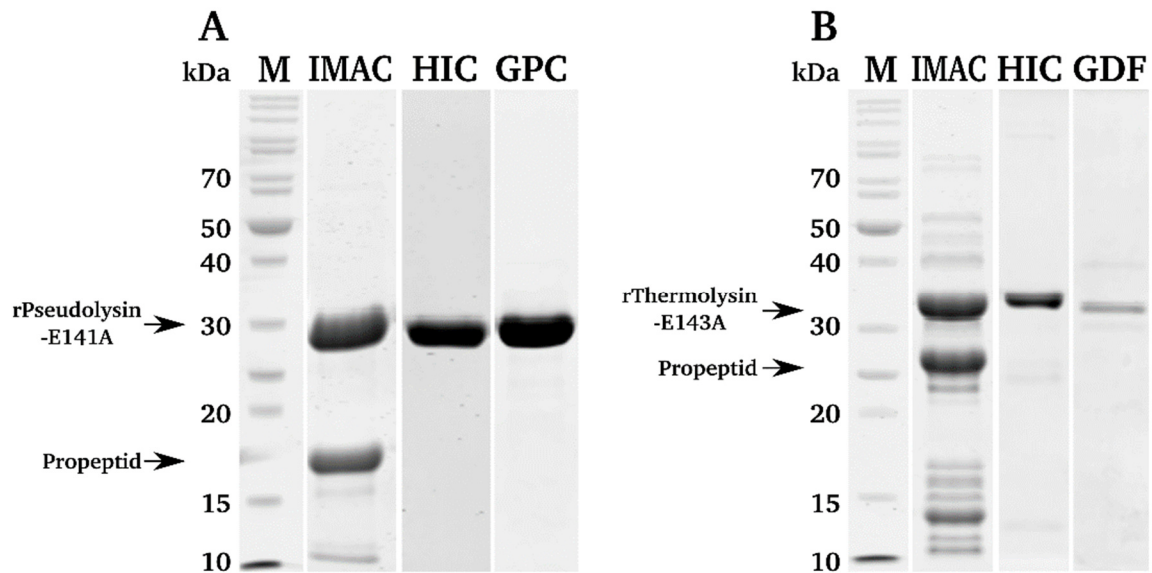
Das prozessierte rBacillolysin-E138A zeigte unter den verwendeten Bedingungen der GPC zwei Peakmaxima nach 69.9 min und 81.4 min. Jedoch stimmte nur der zweite Peak mit dem Elutionsverhalten von rBacillolysin überein, was sich auch in der Reinheit der Fraktionen zeigte (Abb. 4.34, Spuren 7-15). Der erste höhere Peak hingegen enthielt zwar ebenfalls das prozessierte Enzym, jedoch auch mehrere kontaminierende Fragmente, welche sich vermutlich aus bindungsaffine Resten des Propeptids zusammensetzten (Abb. 4.34, Spuren 1-6). Die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen mit hoher Reinheit zwischen 79 min und 89 min wurden abschließend vereinigt, aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

**Tab. 4.5** Übersicht des Reinigungs- und Prozessierungsverfahren für nicht-funktionelle M4-Metalloproteasen

Übersicht		
1	IMAC	Isolation des inaktiven Proenzym-Komplexes
2	IEX (rBacillolysin) HIC (rPseudolysin, rThermolysin)	Reinigung des inaktiven Proenzym-Komplexes
3	Propeptid-Hydrolyse mit Trypsin	Freisetzung des reifen nicht-funktionellen Enzyms
4	GDF	Abtrennung nicht-bindender/denaturierter Enzyme
5	GPC	Endreinigung und Umpufferung des reifen nicht-funktionellen Enzyms

Das so etablierte Verfahren wurde in dieser Arbeit auch bei der Aufarbeitung der anderen nicht-funktionellen M4-Metalloproteasen angewandt (Tab. 4.5).

So konnte neben rPseudolysin-E141A (E141A) auch die nicht-funktionelle Variante von Thermolysin, rThermolysin-E143A (E143A), mit hoher Reinheit isoliert werden (Abb. 4.35). Die Produktion von rAureolysin-E144A hingegen erwies sich, ähnlich wie das aktive Protein, als besonders schwierig und gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr.



**Abb. 4.35 Übersicht der Reinigung und Aufarbeitung von rPseudolysin-E141A (A) und rThermolysin-E143A (B) mit His<sub>6</sub>-Tag.** Die Produktion beider Proteasen erfolgte analog zu rBacillolysin-E138A in *E. coli* BL21 (DE3) mit 10 µM IPTG für 16 h bei 28 °C nach Transformation mit pSAP1 (*Pro*-rPseudolysin-E141A) bzw. pSAT3 (*Pro*-rThermolysin-E143A). Spuren A: M, Molekulargewichtsmarkermischung; IMAC, vereinigte Fraktionen von *Pro*-rPseudolysin-E141A-His<sub>6</sub> nach Isolation über IMAC mit linearem Imidazolgradienten von 0-500 mM bei pH 7.5; HIC, vereinigte rPseudolysin-E141A-Fraktionen nach Propeptid-Hydrolyse mit Trypsin und HIC mit linearem NaCl-Gradienten von 3.0-0 M bei pH 7.5; GPC, Endprodukt der Reinigung von rPseudolysin-E141A nach GPC über Superdex75 unter den in Abb. 4.24 für rBacillolysin beschriebenen Bedingungen. Spuren B: M, Molekulargewichtsmarkermischung; IMAC, vereinigte Fraktionen von *Pro*-rThermolysin-E143A-His<sub>6</sub> nach Isolation über IMAC mit linearem Imidazolgradienten von 0-500 mM bei pH 7.5; HIC, vereinigte rThermolysin-E143A-Fraktionen nach Propeptid-Hydrolyse mit Trypsin und HIC mit linearem NaCl-Gradienten von 2.5-0 M bei pH 7.5; GDF, Endprodukt der Reinigung von rThermolysin-E143A nach Elution über GDF durch pH-Erhöhung von 5.5 auf 8.5 analog zu rBacillolysin (vgl. Abb. 4.23).

Dies war jedoch höchstwahrscheinlich auf die im Gegensatz zu den anderen M4-Proteasen fehlende stabilisierende Interaktion nach erfolgreicher Faltung zwischen Propeptid und reifem Aureolysin zurückzuführen. [224]

**Tab. 4.6 Ausbeute und Schmelzpunkte der verwendeten und rekombinant hergestellten M4-Metalloproteasen**

Protease(-Variante)	Ausbeute <sup>a</sup> (mg·l <sup>-1</sup> )	Schmelzpunkt <sup>b</sup> (°C)
<i>Dispase</i> ( <i>P. polymyxa</i> )	-	66.2
rBacillolysin	~10	65.5
rBacillolysin-E138A	~12	64.3
rAureolysin	~0.01	-
Thermolysin ( <i>G. stearothermophilus</i> )	-	92.7
rThermolysin	~3	87.6
rThermolysin-E143A	~6	86.8
Pseudolysin ( <i>P. aeruginosa</i> )	-	~76.0 [225]
rPseudolysin-E141A	~25	76.4

<sup>a</sup> gereinigtes Protein pro Liter Kulturbrühe; <sup>b</sup> ermittelt über intrinsische Fluoreszenz (nanoDSF: λ<sub>ex</sub> 280 nm, λ<sub>em.1</sub> 330 nm, λ<sub>em.2</sub> 350 nm), N=2.

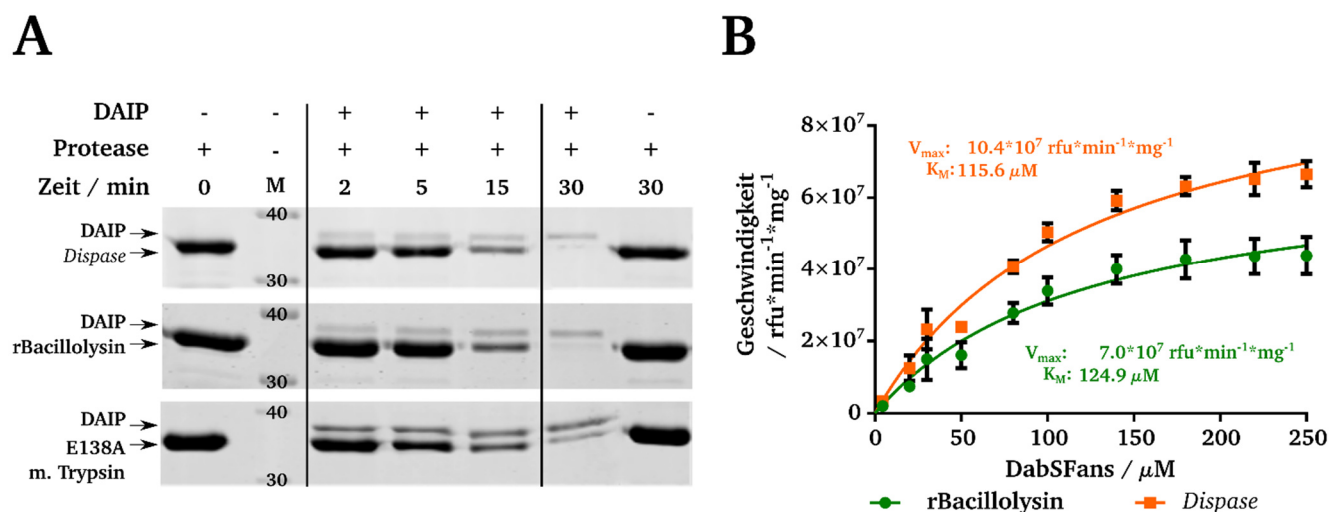


Die native Faltung der in dieser Arbeit produzierten aktiven und nicht-funktionellen Proteasen wurde neben Aktivitätstests und GDF-Bindung zusätzlich über Schmelzpunktbestimmungen bestätigt (Tab. 4.6).

#### 4.2.4. Charakterisierung und Inhibierung von rBacillolysin

Um sicherzustellen, dass das rekombinante Bacillolysin, trotz geringer Abweichungen in der Aminosäuresequenz, die Eigenschaften des kommerziellen Enzyms *Dispase* hatte, wurden der Einfluss von DAIP unter Standardbedingungen, die pH-Abhängigkeit sowie die kinetischen Parameter vergleichend untersucht. DAIP wurde hierfür zunächst in einem zehnfachen Unterschuss mit der jeweiligen Protease bei 37 °C inkubiert; nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und über SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.36, A). Dabei zeigte sich, dass rekombinant produziertes Bacillolysin wie *Dispase* in Anwesenheit von DAIP innerhalb von 30 min einer kompletten Autolyse unterlagen, was sich über die stetige Abnahme der Protease-Bande beobachten ließ. Wie auch schon in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, war es durch die schnelle Hydrolyse nicht möglich diskrete Autolyse-Fragmente für eine N-terminale Sequenzierung zu identifizieren.

Eine Besonderheit zeigte sich jedoch bei der nicht-funktionellen Bacillolysin-Variante E138A im Beisein von DAIP. Trotz fehlender proteolytischer Aktivität, zeigte eine E138A-DAIP-Mischung nach etwa 2 h auch eine langsame Abnahme der Protease-Bande (nicht gezeigt). Untersuchungen mit diversen Proteaseinhibitoren ergaben, dass die beobachtete proteolytische Aktivität von Spuren der zur Prozessierung des Propeptids eingesetzten externen Protease Trypsin ausging. Der Nachweis dafür gelang hierbei durch den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SYPRO-Orange-Assay (vgl. Abb. 4.47).



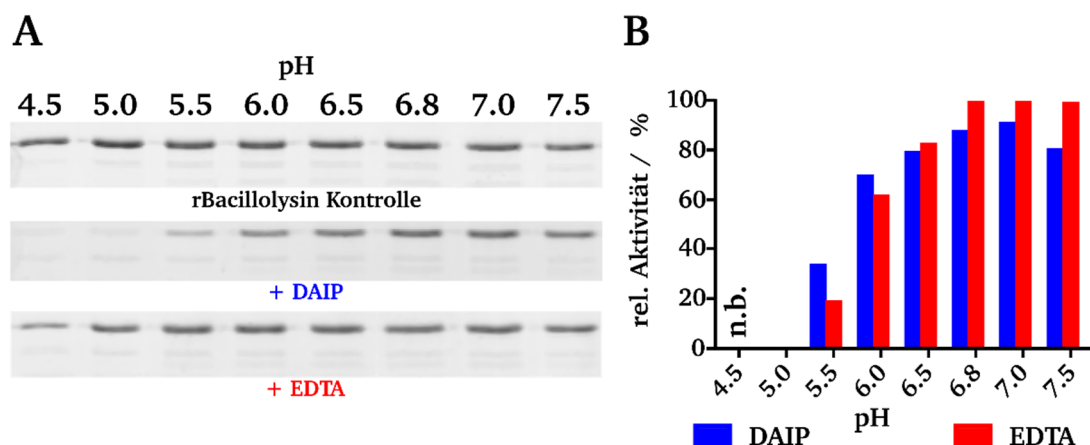
**Abb. 4.36 DAIP-vermittelte Autolyse und Aktivität von rekombinantem rBacillolysin und *Dispase*.** A, DAIP-induzierte Hydrolyse von M4-Metalloproteasen. 10  $\mu\text{M}$  *Dispase*, rBacillolysin bzw. E138A wurden mit 0.5  $\mu\text{M}$  DAIP bis zu 30 min bei 37 °C inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten denaturiert. Als prozessierenden Protease wurden in den Ansatz mit E138A 75 nM Trypsin zugegeben. Die Auftrennung und Visualisierung erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. B, Michaelis-Menten-Kinetik von *Dispase* (orange) bzw. rBacillolysin (grün) und *DabSFans*. 10-250  $\mu\text{M}$  *DabSFans* wurden mit 10 nM *Dispase* bzw. rBacillolysin bei 37 °C und pH 7.5 mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  umgesetzt. Die jeweilige Steigung der Fluoreszenzzunahme bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ , 320 nm) mit N=3 wurde als  $\text{rfu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  gegenüber der Substratkonzentration aufgetragen. Die Ermittlung von  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  erfolgte über nichtlineare Regression mit GraphPad 5.

Interessanterweise erfolgte die E138A-Hydrolyse durch Trypsin aber ausschließlich in Anwesenheit von DAIP (Abb. 4.36, A).

Neben der Interaktion mit dem Autolyse-induzierenden Protein wurden ebenfalls die kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_M$  der rekombinanten und nativen Protease über *DabSFans*-Hydrolyse bestimmt. Diese unterschieden sich jedoch mit Michaelis-Konstanten von  $115.6 \mu\text{M}$  (*Dispase*) bzw.  $124.5 \mu\text{M}$  (rBacillolysin) nicht signifikant voneinander (Abb. 4.36, B). Die maximale Umsatzgeschwindigkeit des Substrats durch rBacillolysin lag im direkten Vergleich mit  $7.00 \cdot 10^7 \text{ rfu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  etwa 32% unter der von *Dispase*, was jedoch für die durchgeführten Untersuchungen vernachlässigbar war.

Zur Aufklärung des Mechanismus wurde daher vergleichend die Azocasein-Hydrolyse von rBacillolysin jeweils mit einem definierten Unter- bzw. Überschuss an DAIP (1:250) und EDTA (12.5:1) bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht und die Ansätze über SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.37).

Dabei zeigte sich zunächst, dass die Protease zwar über einen breiten pH-Bereich stabil blieb (Abb. 4.37, A), jedoch die Aktivität im Säuren, bis zum vollständigen Verlust bei pH 4.5 abnahm (Abb. 4.37, A), jedoch die Aktivität im Säuren, bis zum vollständigen Verlust bei pH 4.5 abnahm (Abb. 4.37, B und Abb. 4.38, D).

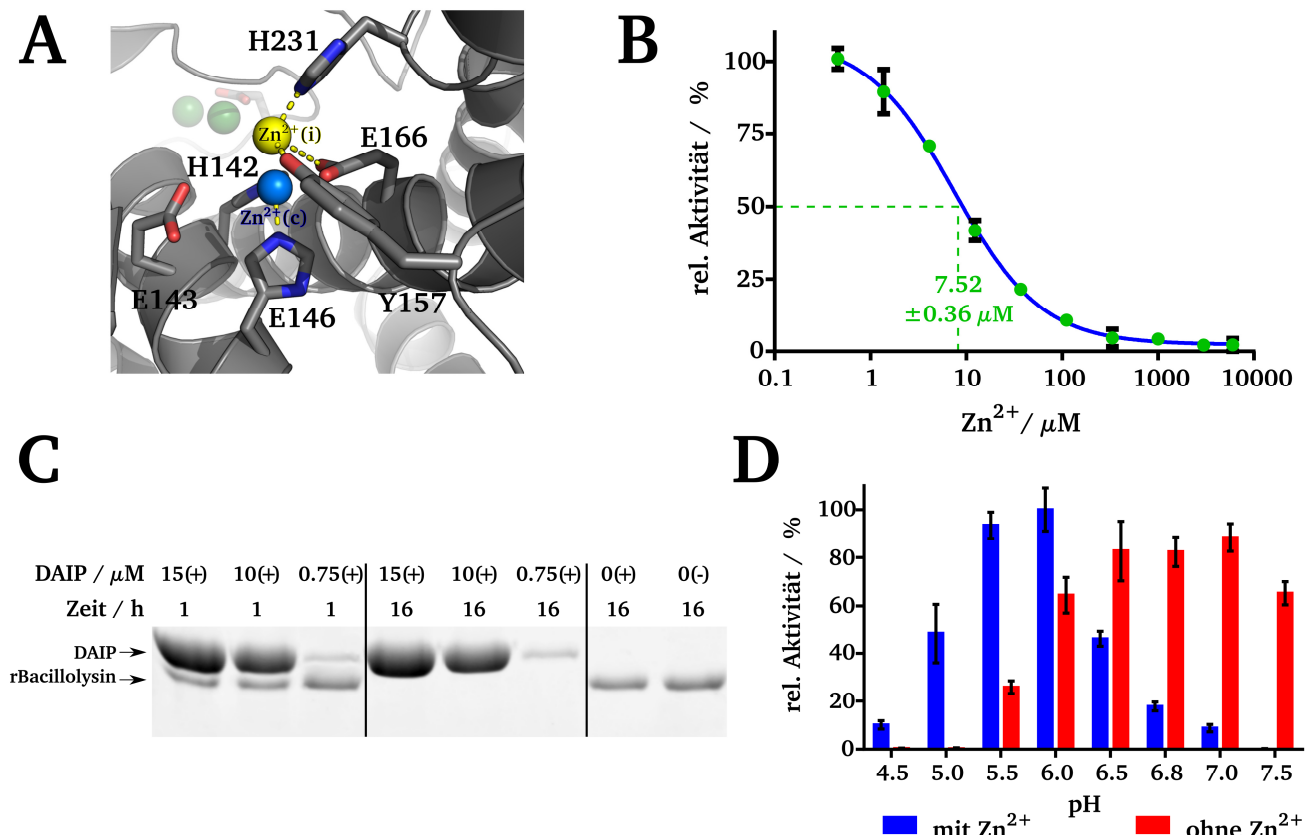


**Abb. 4.37 Einfluss des pHs auf die DAIP- bzw. EDTA-induzierte Inaktivierung und Autolyse von Bacillolysin.** A, rBacillolysin-Stabilität in Anwesenheit von DAIP bzw. EDTA in Abhängigkeit des pHs. 10  $\mu\text{M}$  rBacillolysin wurden alleine (Kontrolle) oder mit 40 nM DAIP (I:E=1:250) bzw. 125  $\mu\text{M}$  EDTA (I:E=12.5:1) bei 37 °C und pH 7.5 für 35 min inkubiert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. B, rBacillolysin-Aktivität in Anwesenheit von DAIP bzw. EDTA in Abhängigkeit des pHs. Es wurden 0.75  $\mu\text{M}$  rBacillolysin mit 3 nM DAIP bzw. 10  $\mu\text{M}$  EDTA bei 37 °C und pH 7.5 für 15 min vorinkubiert. Die Zugabe und Hydrolyse von Azocasein erfolgte anschließend für weitere 20 min. Die Reaktion wurde abschließend durch Zugabe von 10%iger TCA beendet und die Extinktion bei 420 nm bestimmt. Die Auftragung erfolgte normiert auf die jeweilige Positivkontrolle bei entsprechendem pH. Die Einstellung des pHs erfolgte jeweils zwischen 4.5 und 5.5 mit 100 mM Na-Acetat, von 6.0-7.0 mit 100 mM Bis-Tris und bei pH 7.5 mit 100 mM Tris.

Trotz der geringen Konzentration waren unterhalb von pH 6.5 verstärkt die autolytischen Effekte des DAIPs zu erkennen, was mit einer Abnahme der Proteasebande und einer damit verbundenen reduzierten proteolytischen Restaktivität einherging. Die eingesetzte EDTA-Konzentration wurde so eingestellt, dass ein zu DAIP äquivalenter Effekt auf die Aktivität zu beobachten war (Abb. 4.37, B). Es konnte jedoch hier im Gegensatz zu DAIP erst bei pH 4.5 eine einsetzende Autolyse beobachtet werden. Der bei höherem pH beobachtete Aktivitätsverlust war hingegen wahrscheinlich auf den Entzug des katalytischen Zink-Ions zurückzuführen.



Die durchgeführten Untersuchungen legten nahe, dass die Wirkungsweise von DAIP und EDTA sich aufgrund des großen Konzentrationsunterschieds grundsätzlich unterscheiden müssen und eine Destabilisierung des Enzyms über Calciumentzug durch DAIP auszuschließen ist.



**Abb. 4.38 Inhibition und reduzierte Autolyse-Rate von rBacillolysin aus *P. polymyxa* DSM-36 in Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Ionen (Auszug aus Fiebig *et al.*, 2018).<sup>[226]</sup>** A, Aktivzentrum von zinkinhibiertem Thermolysin (PDB ID: 1LND). Die Seitenketten der Zn<sup>2+</sup>- (c: katalytisch (blau); i: inhibitorisch (gelb)) und Ca<sup>2+</sup>-bindenden (grün) Aminosäuren sind als *Sticks* hervorgehoben. Das zweite Zn<sup>2+</sup>-Ion nimmt die Position des typischerweise Zink-gebundenen Wassers ein. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt. B, IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Bacillolysin und ZnCl<sub>2</sub>. 100 nM rBacillolysin und 0.45 mM bis 6 mM ZnCl<sub>2</sub> in 50 mM Tris pH 7.5 mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> wurden für 15 min bei RT vorinkubiert. Die relative Restaktivität wurde anschließend über *DabSFans*-Hydrolyse durch Bestimmung der Fluoreszenzintensitätsteigerung über die Zeit bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm) mit N=3 ermittelt und gegenüber der Zn<sup>2+</sup>-Konzentration aufgetragen. Die IC<sub>50</sub>-Bestimmung erfolgte über nichtlineare Regression mit GraphPad 5. C, verzögerte Autolysegeschwindigkeit von zinkinhibiertem Bacillolysin mit DAIP. Proteinmuster von 5 μM rBacillolysin mit(+) und ohne(-) 3 mM ZnCl<sub>2</sub> nach Inkubation mit 0.75 bis 15 μM DAIP bei 37 °C in 50 mM Tris und 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.5 für bis zu 16 h. Die Auftrennung und Visualisierung erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. D, pH-Abhängigkeit der Zn<sup>2+</sup>-Inhibition von Bacillolysin. 100 nM rBacillolysin mit 3 mM ZnCl<sub>2</sub> wurden jeweils bei angegebenem pH für 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend die Restaktivität über *DabSFans*-Hydrolyse mit N=3, wie in (B) beschrieben, bestimmt. Die Normierung erfolgte auf die höchste ermittelte Aktivität bei pH 6.0 mit ZnCl<sub>2</sub>.

Diese Annahme wurde zusätzlich durch Sättigungsversuche von DAIP mit bis zu 100 mM Calcium gestützt, welche keinen Einfluss auf die inaktivierende Wirkung erkennen ließen (nicht gezeigt). Es stellte sich hingegen mit zunehmender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine generelle Aktivitätsabnahme der Protease ein (Abb. 7.4). Aufgrund dieser Ergebnisse und mangelnder von DAIP ausgehender hydrolytischer Aktivität ist daher anzunehmen, dass die Wirkung des Autolyse-induzierenden Proteins nicht durch chemische, sondern vielmehr durch subtile konformationelle Modifikation der Proteasen hervorgerufen wird.

---

Zur näheren Untersuchung der DAIP-Bacillolysin-Interaktion wurde zunächst versucht, den autokatalytischen Abbau der Protease durch Inhibition zu verhindern. Effektive Inhibitoren von Metalloproteasen sind unter anderem Phosphoramidon und zweiwertige Zink-Ionen (Abb. 4.38, A).

Im Gegensatz zu Thermolysin konnte Phosphoramidon jedoch Bacillolysin nicht vollständig inhibieren und damit die DAIP-induzierte Autolyse nur leicht verlangsamen (nicht gezeigt). In M4-Metalloproteasen wird bei höheren  $\text{ZnCl}_2$ -Konzentrationen neben dem katalytischen ( $\text{Zn}^{2+}(\text{c})$ ) ein zweites  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion ( $\text{Zn}^{2+}(\text{i})$ ) über Tyr157, Glu166 und His231 komplexiert, welches die Substratbindetasche durch sterischen Ausschluss blockiert. Deshalb wurde im Folgenden der Einfluss von  $\text{Zn}^{2+}$  auf die Bacillolysin-Aktivität näher untersucht (Abb. 4.38, B). Dabei zeigte sich, dass bereits  $7.5 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  die Aktivität von Bacillolysin bei pH 7.5 um die Hälfte reduzierte und, dass Konzentrationen über 3 mM ausreichten, die Hydrolyse von Azocasein, *FaGFa* oder *DabSFans* komplett zu unterbinden. Im Weiteren konnte mit zinkinhibiertem Bacillolysin zwar eine stark verlangsamte Autolyse in Anwesenheit von DAIP bei pH 7.5 beobachtet werden (vgl. Abb. 4.36, A), jedoch verschwand das Protein letztlich auch bei weiterer Inkubation über Nacht (Abb. 4.38, C). Gleichgewichtsbedingte Spuren an nicht-inhibiertem Enzym reichten demnach weiterhin aus, um die Autolyse der durch DAIP modifizierten Proteasemoleküle zu induzieren.

Somit stellte die biochemische Inhibition kein geeignetes Mittel zur vollständigen Vermeidung der DAIP-vermittelten Autolyse dar, welche zur näheren Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion jedoch unerlässlich war. Dies war der wesentliche Grund, weshalb neben den aktiven Formen der untersuchten Proteasen auch deren nicht-funktionelle Varianten durch Austausch des katalytischen Glutamats gegen Alanin produziert wurden. <sup>[180]</sup>

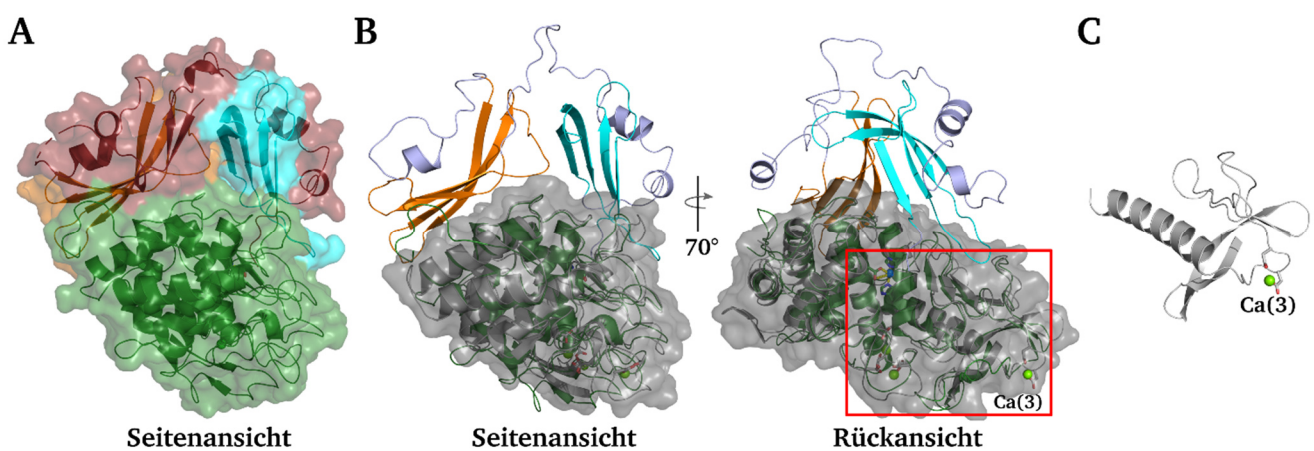
Interessanterweise war die beobachtete  $\text{Zn}^{2+}$ -Inhibition stark pH-abhängig (Abb. 4.38, D). Zum einen zeigte sich im Falle des nicht-inhibierten Enzyms das für M4-Metalloproteasen typische breite pH-Optimum zwischen pH 6.0 und pH 7.5, wohingegen die Aktivität des inhibierten Enzyms erst mit niedrigerem pH unterhalb von pH 7.5 langsam zunahm bis sie bei pH 6.0 schließlich sogar über der unter Standardbedingungen untersuchten Protease lag (pH 7.5).

Die Abnahme der inhibitorischen Potenz des zweiten  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions mit zunehmender Azidität war dabei wahrscheinlich auf die Protonierung von His231 zurückzuführen. Der leicht aktivierende Effekt hingegen war vermutlich bei abnehmendem pH mit einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Apo- und Holoenzym hin zu Letzterem zu erklären. Die Zinkinhibition stellt somit eine „schaltbare“ Form der Inhibition von M4-Metalloproteasen dar, welche jedoch für die Untersuchung des DAIP-Mechanismus nicht geeignet ist.

#### **4.2.5. *In-vitro*-Propeptid-Prozessierung von M4-Metalloproteasen**

Durch die Co-Produktion der nicht-funktionellen Proteasen wie rBacillolysin-E138A mit ihrem Propeptid musste zum Ausschluss unerwünschter sterischer Einflüsse bei der DAIP-Interaktion dieses im

nicht-kovalenten Komplex zunächst entfernt werden. Das Propeptid der meisten M4-Metalloproteasen ist bekannt dafür, nach erfolgter Faltung hochaffin auf dem Enzym als intrinsischer Inhibitor gebunden zu bleiben. Wie bei Vibriolysin MCP-02, einer Metalloprotease von *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 (PDB ID: 3NQY), interagiert es dabei hauptsächlich über dessen FTP-Domäne (Abb. 4.39, A, orange) mit der  $\alpha$ -helikalen C-terminalen Domäne (CTD) des Enzyms. Eine Überlagerung mit Bacillolysin und einem auf Basis von *Pro*-Vibriolysin generierten *Phyre*<sup>2</sup>-Modell des Bacillolysin-Propeptids offenbarte dabei die hohe strukturelle Homologie der Proteasen und legte eine analoge Bindung des Bacillolysin-Propeptids nahe (Abb. 4.39, B). Interessanterweise blieb dabei das für die Stabilität von thermolysin-ähnlichen Proteasen essentielle Ca(3) innerhalb der N-terminalen Domäne (NTD) während der Bindung weiterhin frei zugänglich (Abb. 4.39, B und C).

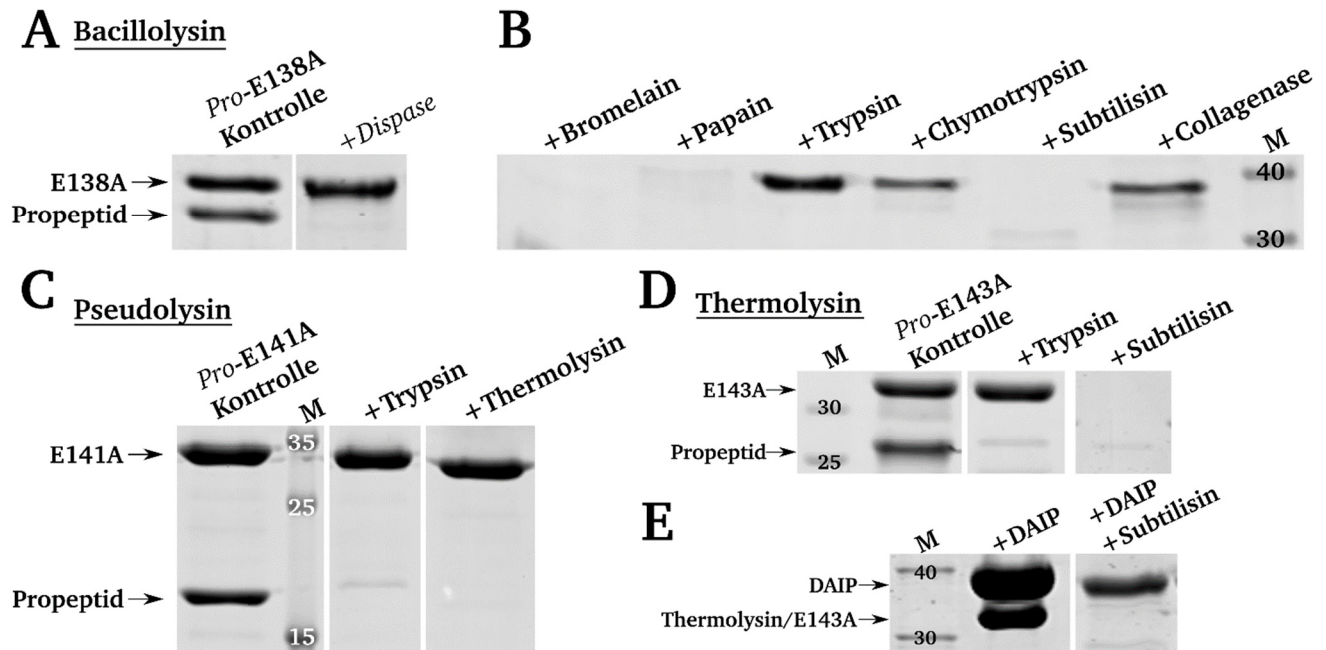


**Abb. 4.39 M4-Metalloproteasen und ihr jeweiliges Propeptid bilden nach korrekter Faltung einen stabilen Protein-Komplex.** A, Tertiärstruktur von Vibriolysin aus *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 (grün) mit gebundenem Propeptid (dunkelrot) (PDB ID: 3NQY). Die FTP- und PepSY-Domänen des Propeptids sind jeweils farblich in orange bzw. cyan hervorgehoben. B, Tertiärstruktur von Bacillolysin (Gentlyase, PDB ID: 4GER, grau) mit gebundenem *Phyre*<sup>2</sup>-Modell des Bacillolysin-Propeptids (hellblau) und Überlagerung mit reifem Vibriolysin (grün). FTP- und PepSY-Domänen sind entsprechend (A) hervorgehoben. <sup>[227]</sup> C, Ausschnitt der  $\beta$ -Faltblatt-Domäne (NTD) von Bacillolysin (Gentlyase) mit gebundenem und frei-zugänglichem Ca(3).

Aufgrund der hohen Affinität des Propeptids zum Enzym war eine Trennung wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben weder chromatographisch noch durch fraktionierende Fällung möglich. Selbst eine partielle Denaturierung der Proteine mit unterschiedlichen Detergenzien bzw. chaotropen Substanzen konnte die starke Interaktion beider Proteine nicht aufheben. Unter physiologischen Bedingungen wird das Propeptid nach erfolgter Faltung autokatalytisch von der Protease selbst abgebaut. Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit versucht *Pro*-rBacillolysin-E138A mit Spuren an *Dispase* proteolytisch von seinem Propeptid zu befreien (Abb. 4.40, A).

Die Prozessierung der nicht-funktionellen *Pro*-rBacillolysin-Variante mit *Dispase* gelang zwar auf der einen Seite aufgrund der natürlichen Präferenz zum Propeptid als Substrat erwartungsgemäß sehr gut, jedoch verblieben Spuren des aktiven Enzyms im Endprodukt. Diese Mengen reichten aus, um in Kombination mit DAIP die vollständige Hydrolyse von E138A zu bewirken. Um Artefakte auszuschließen, wurden alternative Proteasen untersucht, welche in der Lage sind, spezifisch das Propeptid unter Erhalt des reifen Enzyms abzubauen (Abb. 4.40, B). Thermolysin und andere potentielle Interaktionspartner

von DAIP wurden zwar ebenfalls untersucht, aber aufgrund der für *Dispase* angeführten Gründe, trotz spezifischer Propeptid-Hydrolyse, nicht weiterverfolgt.



**Abb. 4.40 Die Propeptidhydrolyse nicht-funktioneller M4-Metalloproteasen erfolgt mit Trypsin ebenso spezifisch und effizient wie mit dem aktiven Enzym.** A und B, *in vitro* Pro-Bacillolysin-E138A-Prozessierung durch Propeptid-Hydrolyse mit unterschiedlichen Proteasen. 10  $\mu$ M Pro-Bacillolysin-E138A wurden jeweils mit 0.1  $\mu$ M *Dispase* (A) bzw. bis zu 1  $\mu$ M der angegebenen Proteasen (B) in 50 mM Tris und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7.5 für 30 min bei RT inkubiert und anschließend über SDS-PAGE (12.5%) analysiert. C, Prozessierung von 15  $\mu$ M Pro-Pseudolysin-E141A mit 0.1  $\mu$ M Trypsin bzw. Thermolysin über 30 min bei 37 °C und pH 7.5. D, Prozessierung von 10  $\mu$ M Pro-Thermolysin-E143A mit 0.1  $\mu$ M Trypsin bzw. Subtilisin über 30 min bei 37 °C und pH 7.5. E, Reaktionsansätze mit 10.5  $\mu$ M aktivem bzw. nicht-funktionellem Thermolysin und DAIP in An- und Abwesenheit von 0.1  $\mu$ M Subtilisin nach 30 min bei 37 °C und pH 7.5.

Alle untersuchten Proteasen bauten das Propeptid zwar ab, aber, mit Ausnahme von Trypsin, ebenfalls das reife Enzym. Nur bei Trypsin war keine Abnahme (Chymotrypsin (EC 3.4.21.1), Collagenase (EC 3.4.24.3)) oder ein komplettes Verschwinden (Bromelain (EC 3.4.22.32), Papain (EC 3.4.22.2), Subtilisin (EC 3.4.21.62)) der E138A-Bande zu erkennen. Damit stellte die Serinprotease zunächst das Mittel der Wahl zur spezifischen Prozessierung der nicht-funktionellen rBacillolysin-Variante dar (vgl. Abb. 4.32). Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit Pro-rPseudolysin-E141A und Pro-rThermolysin-E143A durchgeführt (Abb. 4.40, C und D). Auch hier erwies sich Trypsin als ein adäquates Werkzeug zur Auflösung des Pro-Enzym-Komplexes. Wie bereits bei E138A zu beobachten war, entfernte Thermolysin ebenfalls spezifisch das Propeptid von rPseudolysin-E141A, jedoch wurde, durch Western Blot verifiziert (nicht dargestellt), das C-terminale Peptid des nicht-funktionellen rPseudolysins auch verkürzt (Abb. 4.40, C). Interessanterweise blieb jedoch diese terminale Prozessierung des reifen E141A in Anwesenheit von DAIP auch bei langen Inkubationszeiten vollständig aus. Subtilisin wiederum stellte die einzige untersuchte Protease dar, welche in der Lage war, neben dem Propeptid auch das extremophile Thermolysin zu hydrolysieren (Abb. 4.40, D). Dieses Ergebnis gab Anlass ein bereits 2009 von Sarafeddin *et al.* durchgeführtes Experiment, bei dem Thermolysin und DAIP zusammen inkubiert wurden, zu wiederholen (Abb. 4.40, E). [62]

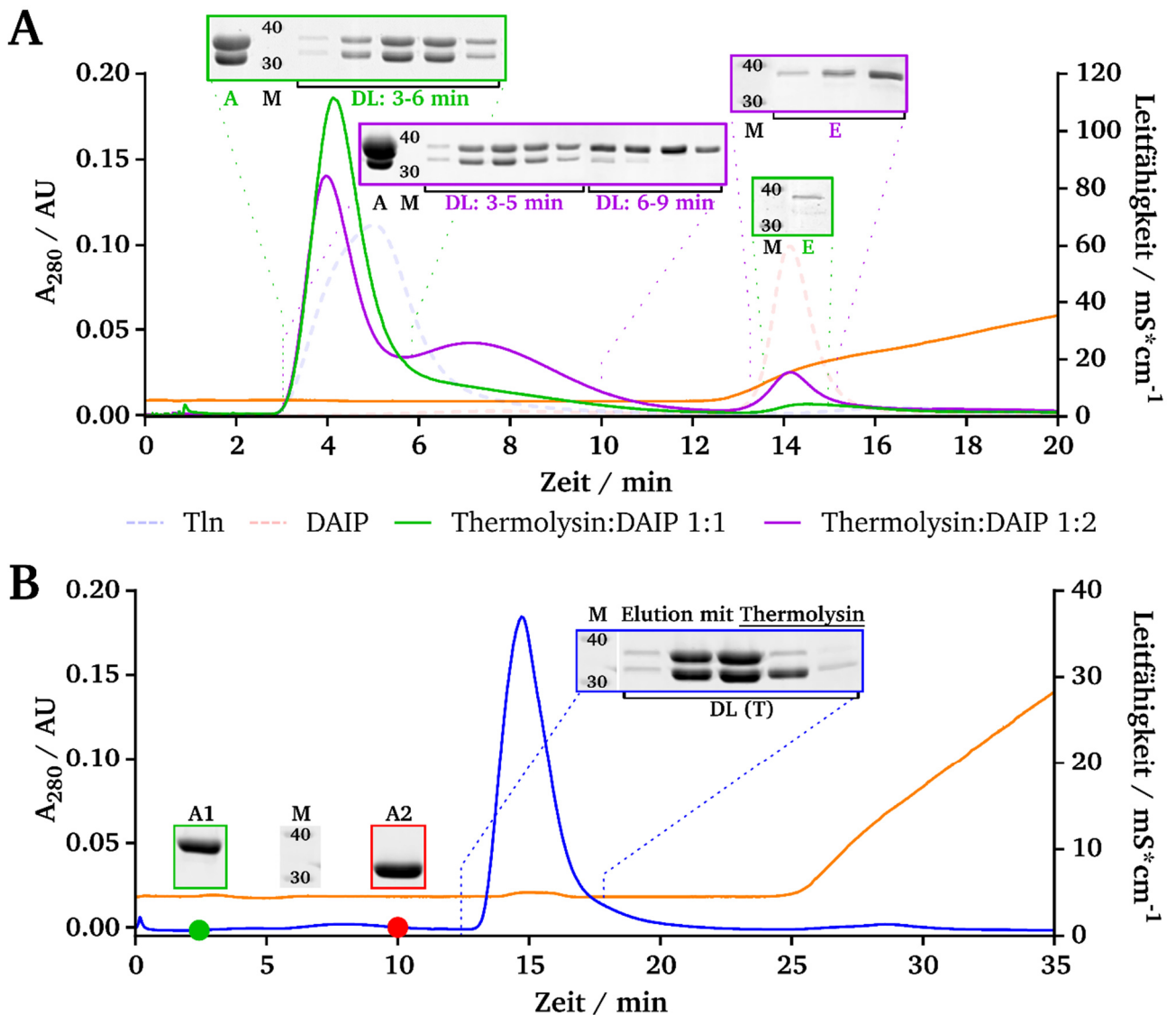
---

Dabei zeigte sich, dass bei den untersuchten Bedingungen innerhalb von 30 min nur in dem Ansatz mit DAIP und Subtilisin eine komplette Hydrolyse von Thermolysin und zusätzlich ein partieller Abbau des Autolyse-induzierenden Proteins zu beobachten war. Ohne die prozessierende Protease blieben DAIP und Thermolysin hingegen im untersuchten Zeitraum stabil. Die 2009 beobachtete schnelle Hydrolyse beider Proteine war demnach wahrscheinlich auf eine Kontamination der damals verwendeten Charge mit einer prozessierenden Protease, wie bspw. Subtilisin, zurückzuführen. Wie im Folgenden noch detaillierter beleuchtet wird, unterliegt zwar auch Thermolysin einer DAIP-vermittelten Autolyse, jedoch verläuft diese ohne weitere Zusätze im Gegensatz zu Bacillolysin/*Dispase* deutlich langsamer (vgl. Abb. 4.46, D und Abb. 4.48, B).

#### **4.2.6. DAIP-Protease-Interaktionsstudien**

Zur Untersuchung einer nachhaltigen „Schädigung“ der Zielprotease durch DAIP sollten Ansätze bestehend aus Thermolysin und DAIP für einen definierten Zeitraum zusammen inkubiert und anschließend wieder getrennt werden. Da DAIP bei pH 8.0 an das AEX-Material Fractogel EMD TMAE adsorbierte (Abb. 4.41, A, hellrot gestrichelt), während Thermolysin dies nicht tat (hellblau gestrichelt), erschien die chromatographische Trennung über IEX als ein geeignetes Mittel zur Separierung beider Proteine. Dabei ergaben sich die ersten Hinweise darauf, dass Thermolysin und DAIP einen stabilen Protein-Komplex ausbilden. Beide Proteine eluierten nach gemeinsamem Auftrag in einem äquimolaren Verhältnis von der Säule, wohingegen die erwartete NaCl-vermittelte Elution von DAIP fast gänzlich ausblieb (Abb. 4.41, A, grüne Linie). Durch Verdopplung der DAIP-Konzentration wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, bei denen beide Proteine zunächst in einem eindeutigen 1:1-Verhältnis im ersten Hauptpeak eluierten (Abb. 4.41, A, lila Linie). Der folgende deutlich breitere Peak hingegen enthielt relativ konstante Mengen an DAIP mit zunehmend geringerem Anteil an Thermolysin. Die Interaktion von DAIP mit dem Säulenmaterial wurde demnach durch Thermolysin aufgrund der deutlich höheren Affinität gestört, wobei selbst Spuren des Enzyms dafür ausreichten. Diese Beobachtung wurde im Folgenden durch ein Verdrängungsexperiment gestützt, bei dem zunächst DAIP an Fractogel EMD TMAE bei pH 8.0 vollständig adsorbiert wurde (Abb. 4.41, B, grüner Punkt). Anschließend wurde die doppelte Menge an Thermolysin auf die Säule aufgegeben (Abb. 4.41, B, roter Punkt), was umgehend zur Co-Elution beider Proteine im bekannten 1:1-Verhältnis führte (Abb. 4.41, B, blaue Linie). Überschüssiges Thermolysin hingegen eluierte nach dem Protein-Komplex in der auslaufenden Flanke des Peaks.

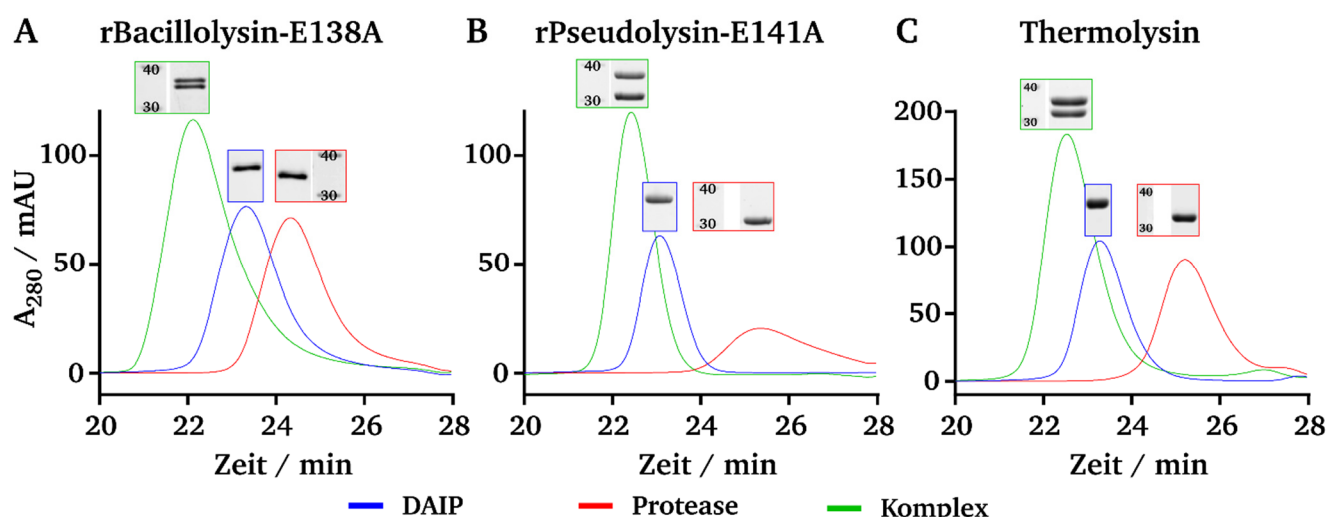




**Abb. 4.41 Erste Hinweise auf die Komplexbildung von DAIP und Thermolysin über TMAE-Pull-Down (Auszug aus Fiebig *et al.*, 2018).** <sup>[226]</sup> A, 20  $\mu\text{M}$  DAIP (hellrot gestrichelt) bzw. Thermolysin (hellblau gestrichelt) wurden einzeln in 50 mM Tris und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  mit  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  auf eine 4-ml-Fractogel EMD TMAE-Säule bei pH 8.0 aufgegeben, gewaschen und mittels linearem NaCl-Gradienten eluiert. Analog wurde mit Mischungen von 27.9  $\mu\text{M}$  (grün) bzw. 55.8  $\mu\text{M}$  DAIP (lila) und 27.9  $\mu\text{M}$  Thermolysin verfahren. Die Leitfähigkeit ist in orange dargestellt. Einschübe: Chromatographiefraktionen von DAIP (oben) und Thermolysin (unten) zu den angegebenen Zeiten. Spuren: A, Auftrag; M, Molekulargewichtsmarkermischung; DL, Durchlauf; E, Elution. B, Verdrängung von TMAE-adsorbiertem DAIP durch Thermolysin. 8  $\mu\text{M}$  DAIP wurde zunächst bei pH 8.0 an das TMAE-Material gebunden (blaue Linie) und gewaschen (grüner Punkt). Anschließend wurden 16  $\mu\text{M}$  Thermolysin aufgegeben (roter Punkt), gewaschen und die adsorbierten Proteine mit NaCl von 0-1 M (orangene Linie) eluiert. Spuren: A1, Auftrag 1 (DAIP); A2, Auftrag 2 (Thermolysin); DL (T), Durchlauf nach Thermolysin-Auftrag.

Die Komplexbildung von DAIP und seinen Interaktionspartnern konnte weiterhin auch über analytische Größenausschlusschromatographie bei pH 8.0 verifiziert werden (Abb. 4.42). DAIP eluierte unter diesen Bedingungen typischerweise nach 23.3 min (blaue Linie). Die im Vergleich mit DAIP kleineren Proteasen rBacillolysin-E138A, rPseudolysin-E141A und Thermolysin (rote Linie) verließen die Säule nach 24.3 min, 25.3 min bzw. 25.2 min etwas später. In äquimolaren Mischungen von DAIP und dem jeweiligen Enzym co-eluierten beide Proteine in einem einzelnen Peak jeweils nach 22.1 min, 22.4 min bzw. 22.5 min (grüne Linie) früher. Wie zu erwarten, war aufgrund der größeren hydrodynamischen Radien der Komplexe im Vergleich zu den einzelnen Proteinen eine Verschiebung zu niedrigeren Retentionszeiten zu beobachten.





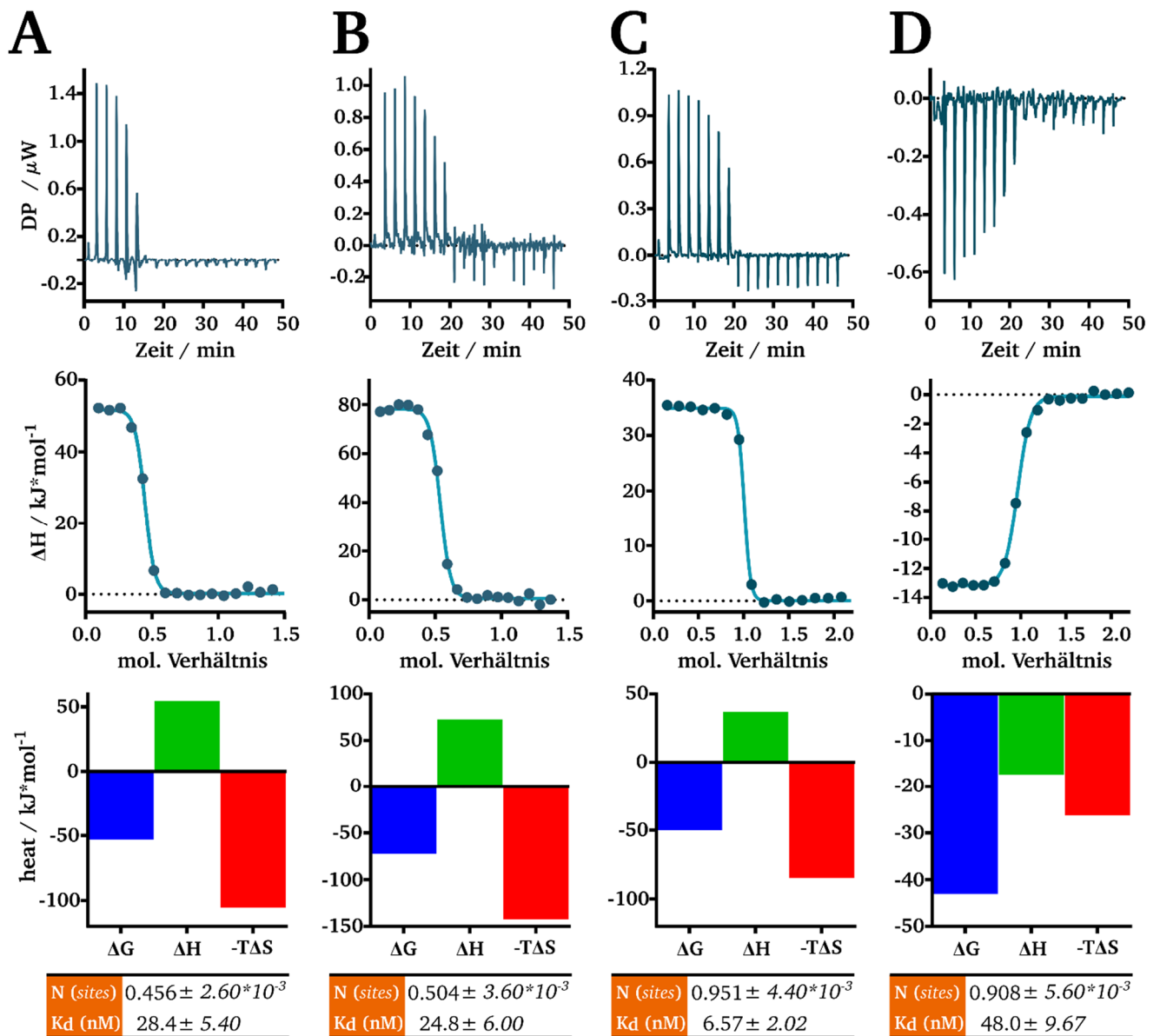
**Abb. 4.42 Nachweis und Isolation stabiler DAIP-Protease-Komplexe über Superdex 200-Größenausschlusschromatographie (Auszug aus Fiebig *et al.*, 2018).** <sup>[226]</sup> 10  $\mu$ M (A/B) bzw. 15  $\mu$ M DAIP (C) (blau) und 10  $\mu$ M rBacillolysin-E138A (A), rPseudolysin-E141A (B) bzw. 15  $\mu$ M Thermolysin (C) (rot) wurden einzeln und in Mischung (grün) über Superdex 200 (3.2/300 *increase*, 2.4 ml) bei 75  $\mu$ l $\cdot$ min $^{-1}$  in 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl und 10 mM CaCl $_2$  getrennt. Die Fraktionen der entsprechenden Peakspitzen wurden über SDS-PAGE (12.5%) analysiert.

Um die Komplexbildung der Proteasen und die thermodynamischen Eigenschaften der Bindung näher zu untersuchen, wurde die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) eingesetzt. DAIP (100-200  $\mu$ M) wurde dafür über 2- $\mu$ l-Injektionen zu 15-20  $\mu$ M der untersuchten Protease oder Proteasevariante bei 30  $^{\circ}$ C titriert (Abb. 4.43). Hierbei zeigten sich zwischen den verschiedenen Substratproteinen von DAIP teils deutliche Unterschiede in Modus, treibender Kraft der Bindung (Enthalpie/Entropie) und molarem Verhältnis der Bindungspartner. Die Interaktion von DAIP und rBacillolysin bzw. der nicht-funktionellen Variante E138A resultierte dabei in endothermen Signalen, welche im Falle des aktiven Enzyms anteilig von Hydrolyse-Wärme überlagert waren. Die Zunahme von Entropie ( $-T\Delta S < 0$ ) überkompensierte in beiden Fällen die positive Enthalpie  $\Delta H$  (Abb. 4.43, A und B) und verschob das Gleichgewicht auf die Seite des Komplexes, was sich in niedrigen Dissoziationskonstanten ( $K_d$ )  $< 30$  nM ausdrückte.

Die Titration von DAIP und rPseudolysin-E141A zeigte ein dazu analoges Verhalten mit positiver Enthalpie, die zwangsläufig wieder für die spontane Komplexbildung mit negativer freier Energie  $\Delta G$  durch Entropiegewinn ausgeglichen wurde. Auch hier konnte die Komplexbildung bestätigt werden, welche jedoch durch die hohe Affinität an die messbedingten Grenzen der Nachweismethode stieß (Abb. 4.43, C).

Die Titration von Thermolysin hingegen ergab exotherme Signale mit negativem  $\Delta H$ . Interessanterweise schmälerte eine geringere negative Entropie den Energiegewinn  $\Delta G$  bei Bildung des Thermolysin-DAIP-Komplexes (Abb. 4.43, D). Die ermittelte  $K_d$  von 48 nM reflektierte ebenfalls die hohe Affinität von DAIP zu Thermolysin. Insgesamt zeigte sich, dass die Bindung von Metalloproteasen an DAIP, mit Ausnahme von Thermolysin, entropisch getrieben ist. Da grundsätzlich die Bindung zweier Moleküle mit einem Verlust an Freiheitsgraden verbunden ist, wurde vermutlich die beobachtete positive Entropie durch Zunahme flexibler Proteinregionen und eine Abnahme der Wasserordnung an den Proteingrenzflächen verursacht. Die berechnete Stöchiometrie von 0.95 und 0.9 stimmte mit den bereits bei den

GPC-Untersuchungen gemachten Beobachtungen eines 1:1-Komplexes für Thermolysin und rPseudolysin-E141A überein.



**Abb. 4.43 Isotherme Titrationskalorimetrie von DAIP und dessen M4-Bindungspartnern bei pH 8.0** (Fiebig *et al.*, 2018). <sup>[226]</sup> 100-200  $\mu\text{M}$  DAIP wurden jeweils über 2- $\mu\text{l}$ -Injektionen zu 20  $\mu\text{M}$  rBacillolysin (A), 15  $\mu\text{M}$  rBacillolysin-E138A (B), 20  $\mu\text{M}$  rPseudolysin-E141A (C) bzw. Thermolysin (D) in 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 30  $^\circ\text{C}$  titriert. Die Rohdaten der Wärmeänderung über die Zeit (oben) wurden durch die PEAQ-ITC Analyse-Software integriert und *gefitted* (Mitte). Die thermodynamischen Parameter  $\Delta G$  (blau),  $\Delta H$  (grün) und  $-T\Delta S$  (rot) sind als *Signature-Plot* dargestellt (unten).

Im Gegensatz dazu wurde in mehreren unabhängigen Messungen für den DAIP-rBacillolysin(-E138A)-Komplex ein Bindungsverhältnis von 0.5 ermittelt, was eine Bindung von DAIP mit zwei Bacillolysinmolekülen nahelegte. Ein ternärer Komplex ließ sich jedoch nicht über GPC bestätigen, welche für alle isolierten Komplexe ähnliches Elutionsverhalten zeigte (vgl. Abb. 4.42). Die rasante Autolyse von Bacillolysin in Anwesenheit von DAIP gibt jedoch Anlass zu der Vermutung, dass, zumindest unter ITC-Bedingungen, das zweite an das erste Bacillolysin-Molekül über Strukturmotive bindet, welche erst in Folge der Interaktion mit DAIP entstehen.

---

Als nächstes wurde über ITC ermittelt, ob DAIP in der Lage ist, neben den reifen Enzymen auch mit *Pro*-rBacillolysin-E138A zu interagieren (vgl. Abb. 4.39). Wie oben erwähnt, überdeckt das Propeptid hauptsächlich die helikale Domäne CTD mit dem Aktivzentrum und nicht die Ca(3)-enthaltende Faltblatt-domäne NTD. Falls DAIP Proteasen durch Entzug dieses frei zugänglichen Ca(3) destabilisiert, sollte die Komplexbildung weiterhin möglich sein. Bemerkenswerterweise blieb die Komplexbildung von *Pro*-E138A im Gegensatz zum reifen Enzym rBacillolysin-E138A mangels detektierbarer ITC-Signale aus (Abb. 7.5). Dies implizierte, dass die Propeptid-bedeckte  $\alpha$ -helikale CTD und nicht die hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblättern zusammengesetzte NTD von Bacillolysin und den anderen Bindungspartnern mit DAIP interagiert. Damit konnten zudem die bereits gemachten Beobachtungen bezüglich der fehlenden Metallionenabhängigkeit bestätigt werden (vgl. 0).

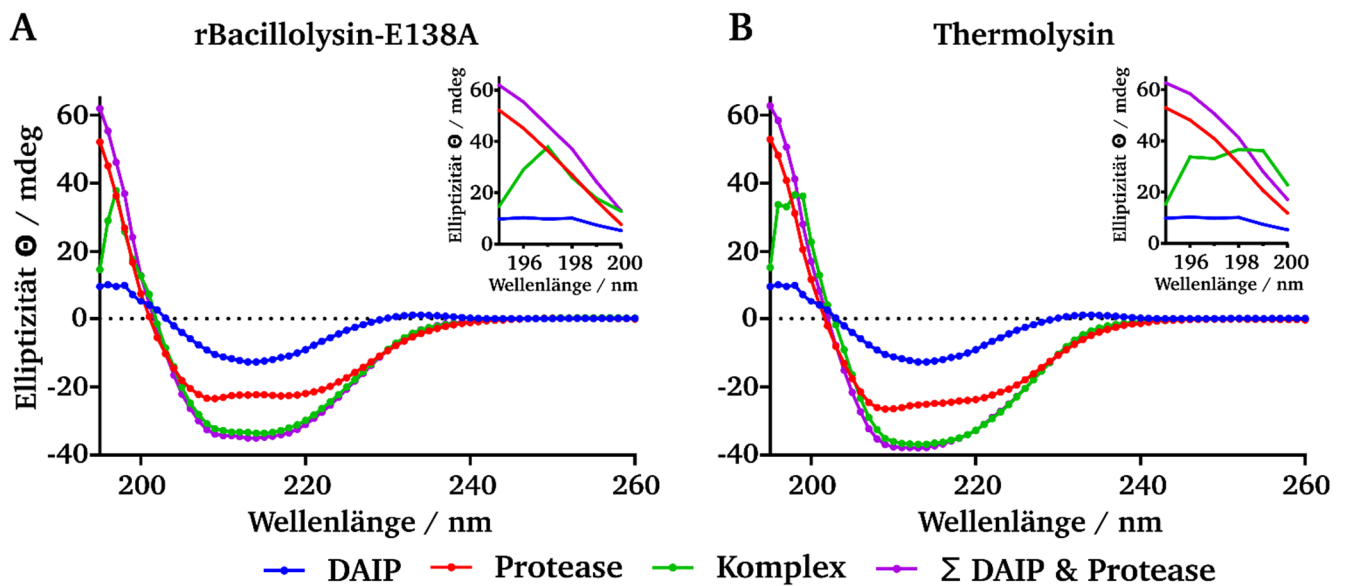
Neben den bereits erwähnten Mitgliedern der M4-Familie wurde auch die Interaktion der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease TAMP (P83543) aus *S. mobaraensis* mit DAIP eingehend untersucht. Wie Sarafeddin *et al.*, 2009 bereits zeigen konnten, ging von DAIP jedoch keine inhibitorische bzw. Autolyse-induzierende Wirkung auf TAMP aus (nicht gezeigt).

Die durchgeführten Untersuchungen über ITC bestätigten das Ausbleiben einer Bindung beider Proteine und offenbarten jedoch Anzeichen einer Hydrolyse. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass nicht TAMP, sondern DAIP zumindest teilweise abgebaut bzw. eingekürzt wurde (vgl. Abb. 7.6).

#### **4.2.7. Konformationelle Veränderungen von M4-Metalloproteasen durch DAIP**

Bindungsstudien und ITC-Experimente konnten bisher die Komplexbildung zwischen DAIP und den Metalloproteasen zeigen und dabei auch den DAIP-vermittelten Entzug des stabilisierenden Ca(3) ausschließen. Das bedeutete im Gegenzug, dass die Aktivität von DAIP auf der Induktion struktureller Veränderungen der Proteasen basieren sollte, welche dadurch anfällig für den proteolytischen Verdau werden. Erste Untersuchungen ergaben, dass DAIP die intrinsische Tryptophanfluoreszenz der Zielproteine nach Assoziation nicht wesentlich verändert. Deshalb wurde der Versuch unternommen, die strukturelle Modifikation der Protease nach DAIP-Bindung über CD-Spektroskopie nachzuweisen (Abb. 4.44). Hierfür wurden äquimolare Mengen von DAIP (blau) und (A) E138A oder (B) Thermolysin (rot) in 5 mM MOPS und 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 6.5 für 15 min bei RT vorinkubiert (grün). Anschließend erfolgte die Aufnahme der CD-Spektren zwischen 195 nm und 260 nm, welche mit denen der individuellen Proteine verglichen wurden. Zusätzlich wurde ein hypothetisches Spektrum durch Aufsummierung der Einzelspektren generiert (lila).

Die Proteasestrukturen, welche zu großen Teilen  $\alpha$ -helikale Strukturelemente enthalten, zeigten sich in einer Mischform mit für Helices typischen Minima bei etwa 210 nm und 222 nm sowie einer zu 195 nm ansteigenden Elliptizität. Interessanterweise ließen sich die Spektren der Komplexe und der aufsummierten Einzelproteine zwischen 200 nm und 260 nm fast nahtlos überlagern, was für keine signifikanten strukturellen Veränderungen der Proteine nach Assemblierung sprach.

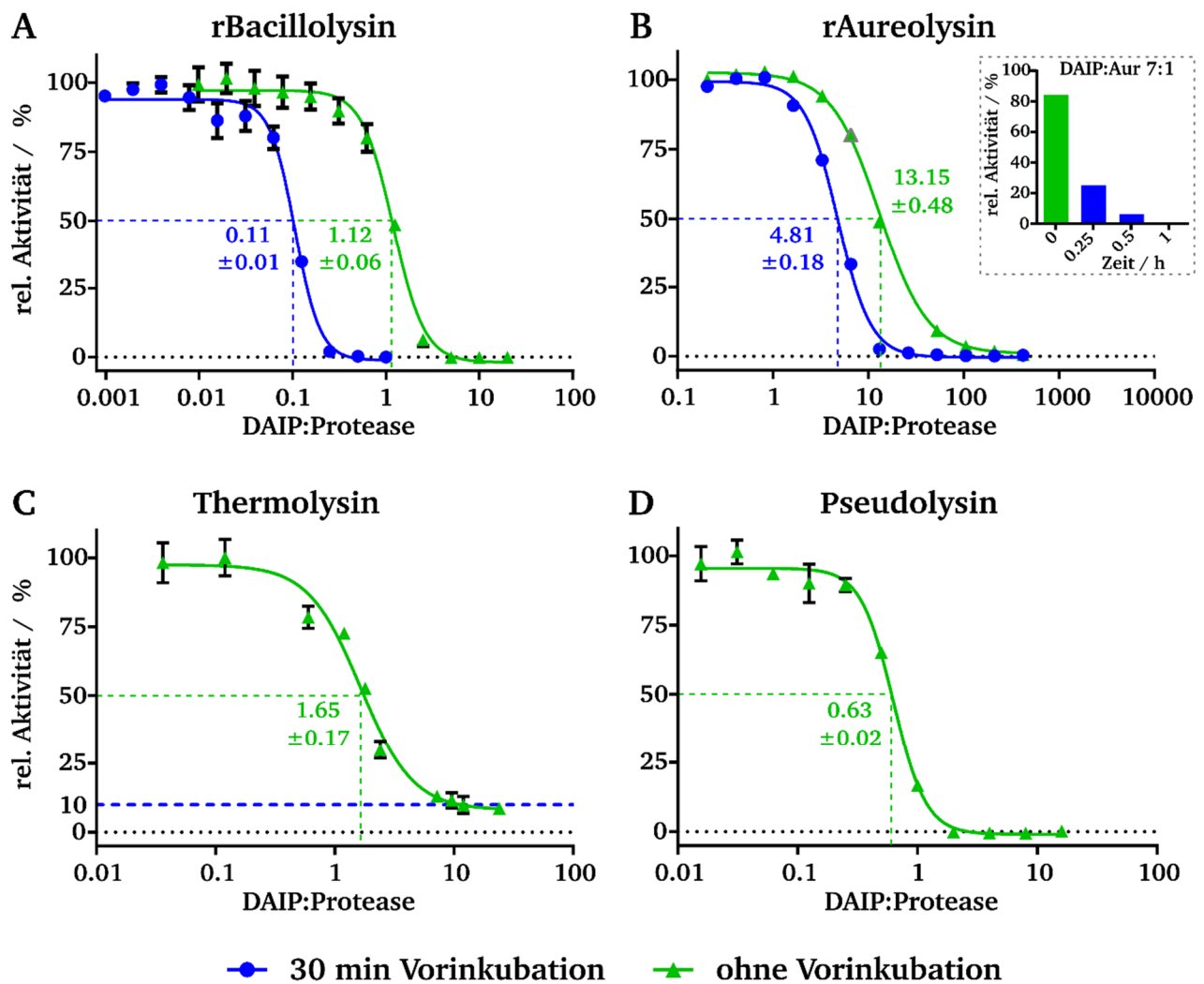


**Abb. 4.44 Circular dichroismus (CD)-Spektren von DAIP und rBacillolysin-E138A (A) bzw. Thermolysin (B) bei pH 6.5.** 6  $\mu$ M DAIP (blau) wurde zunächst mit (A) 6  $\mu$ M rBacillolysin-E138A (rot) bzw. (B) 6  $\mu$ M Thermolysin (rot) gemischt. Die Aufnahme der CD-Spektren der Einzelproteine und Komplexe (grün) erfolgte am Jasco j-815 CD-Spectropolarimeter im Wellenlängenbereich zwischen 195 nm und 260 nm bei 0.1 cm Schichtdicke in 5 mM MOPS pH 6.5 mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  bei RT. Ein hypothetisches Referenzspektrum wurde durch Aufsummierung der Elliptizität der Einzelspektren von DAIP und der jeweiligen Protease erstellt (lila). Ein vergrößerter Ausschnitt der Spektren zwischen 195 nm und 200 nm ist jeweils zusätzlich dargestellt.

Unterschiede zwischen der theoretischen und der ermittelten Elliptizität traten jedoch bei Wellenlängen von 195-200 nm auf, welche Hinweise auf eine Zunahme unstrukturierter Bereiche und damit einer partiellen Entfaltung gaben. Stärkere strukturelle Veränderungen waren insoweit aufgrund der konstanten Tryptophanfluoreszenz auch nicht zu erwarten.

Bisherige Untersuchungen der DAIP-Wirkung basierten meist auf der Inkubation des inaktivierenden Proteins mit der Zielprotease bei 37 °C über einen definierten Zeitraum und der abschließenden Bestimmung der proteolytischen Restaktivität des Enzyms. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse gaben Anlass dazu den Einfluss der Vorinkubationszeit selbst zu untersuchen, um darüber nähere Einblicke in die Interaktionen und die ausgelösten konformationellen Veränderungen zu erhalten. Inhibitionskurven aller identifizierten Zielproteasen mit DAIP wurden daher mit (blau) und ohne 30-minütige Vorinkubation (grün) bei 37 °C über *DabSFans*-Hydrolyse bestimmt (Abb. 4.45). Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit unter den Proteasen und der weitestgehend stöchiometrischen Wirkung des Autolyse-induzierenden Proteins wurde jeweils das DAIP-Protease-Verhältnis gegen die Aktivität aufgetragen. Dabei zeigten sich bereits erste Unterschiede in der Wirkung von DAIP auf die unterschiedlichen M4-Proteasen. Während sich die  $\text{EC}_{50}$ -Werte von DAIP bei rBacillolysin und rAureolysin durch Vorinkubation um einen Faktor von ca. 10 bzw. ca. 3 reduzierten (Abb. 4.45, A und B), konnten zumindest unter den getesteten Bedingungen bei Thermolysin und Pseudolysin keine Unterschiede ermittelt werden (Abb. 4.45, C und D). Die mit steigender Inkubationsdauer abnehmende Restaktivität von rBacillolysin war wahrscheinlich auf die schnelle Hydrolyse in Anwesenheit von DAIP zurückzuführen (vgl. Abb. 4.36, A). Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit rAureolysin gemacht werden (Abb. 4.45, B, Insert).

Der inhibitorische Effekt gegenüber Thermolysin und Pseudolysin, welche nur eine langsame bzw. keine Autolyse erkennen ließen, war demnach ausschließlich auf die Bindung und Modifikation durch DAIP zurückzuführen. Mit Ausnahme von rAureolysin trat bei allen Proteasen bereits bei äquimolaren Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Dipeptid-Hydrolyse ein. Die halbmaximale Restaktivität ( $EC_{50}$ ) für rBacillolysin, Thermolysin bzw. Pseudolysin ergab sich bei einem molaren DAIP:Protease-Verhältnis von 1.1, 1.7 und 0.6. Die um eine Größenordnung höhere Konzentration an DAIP zur Inaktivierung von rAureolysin war wahrscheinlich auf eine niedrigere Affinität zurückzuführen, welche jedoch aufgrund der geringen Ausbeuten nicht über ITC bestätigt werden konnte.



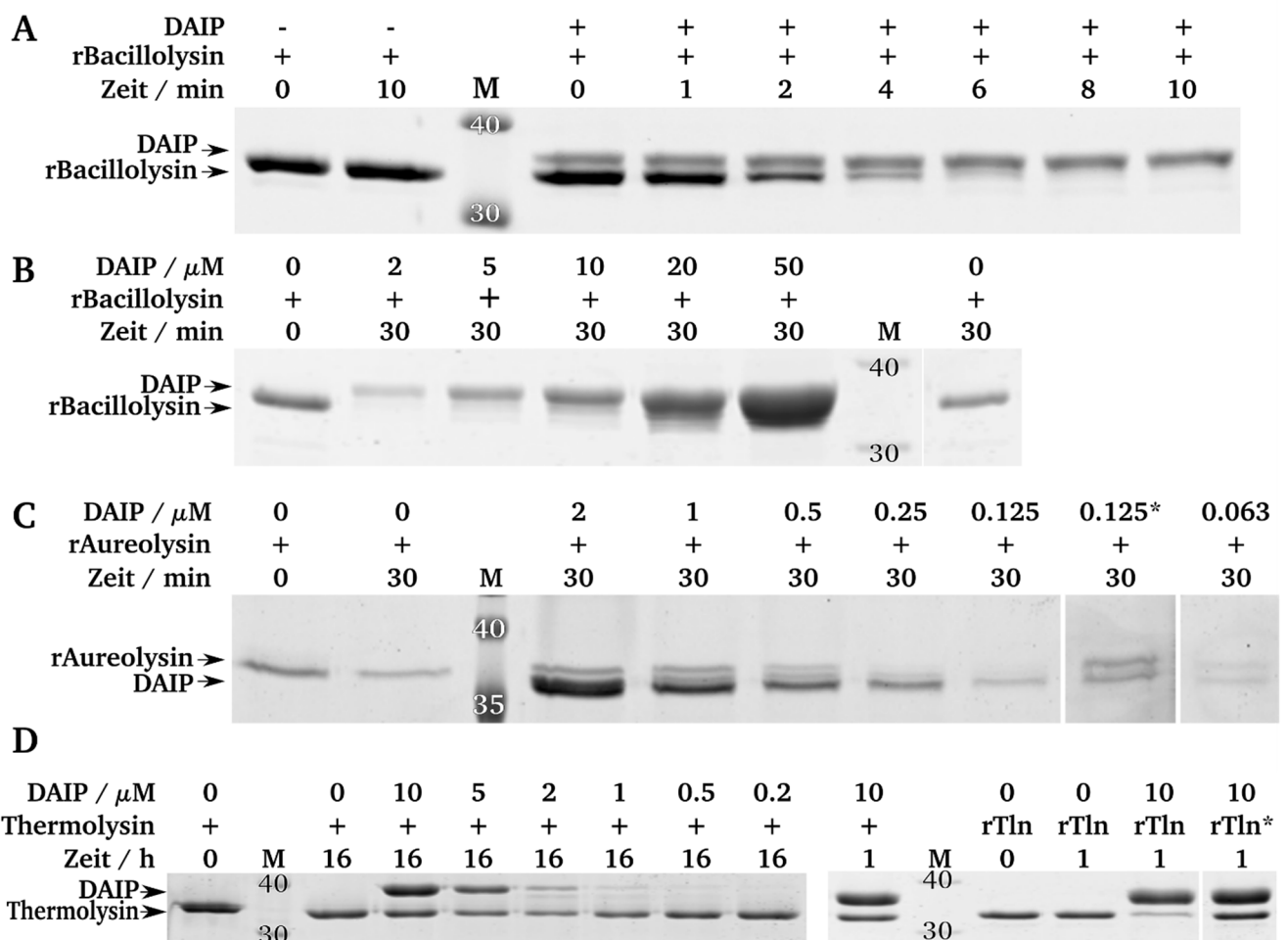
**Abb. 4.45 Konzentrations- und vorinkubationsabhängige Inhibition von M4-Metalloproteasen durch DAIP bei pH 7.5.** Inhibition von (A) 50 nM rBacillolysin, (B) 4.5 nM rAureolysin, (C) 5 nM Thermolysin bzw. (D) 6.5 nM Pseudolysin durch DAIP in den angegebenen Verhältnissen ohne (grün) und mit Vorinkubation von 30 min (blau) bei 37 °C in 50 mM Tris und 2 mM  $CaCl_2$  pH 7.5. Die Restaktivität wurde, mit Ausnahme von rAureolysin, in Triplikaten durch *DabsFans*-Hydrolyse bei 520 nm ( $\lambda_{ex}$  340 nm) und die  $EC_{50}$  durch nichtlineare Regression mit GraphPad 5 bestimmt. Insert (B): Abnahme der Restaktivität von rAureolysin in Anwesenheit eines Überschuss an DAIP (7:1) in Abhängigkeit der Vorinkubationsdauer.

Eine Besonderheit stellte in diesem Zusammenhang Thermolysin dar, welches, im Gegensatz zu den anderen Proteasen, selbst durch hohe DAIP-Konzentrationen nicht vollständig inhibiert werden konnte. Eine Restaktivität von etwa 10% wurde selbst bei 1000-fachem Überschuss an DAIP und Verwendung alternativer Substrate, wie Azocasein, nicht unterschritten (nicht gezeigt). Dies war ein Beleg dafür, dass

die Inhibition durch DAIP nicht auf sterischen Ausschluss des Substrats, sondern vielmehr auf signifikante Veränderungen der Thermolysin-Struktur sowie des Aktivzentrums zurückzuführen war.

#### 4.2.8. Fragmentierungsstudien von M4-Metalloproteasen mit DAIP

Das Dispaseautolyse-induzierende Protein leitet, wie der Name impliziert, die schnelle Autolyse von *Dispase*/Bacillolysin und, wie sich im Rahmen dieser Arbeit zeigte, anderer M4-Metalloproteasen ein. Diese Eigenhydrolyse kann dabei am einfachsten über SDS-PAGE verfolgt werden. Die Besonderheit, dass DAIP die Induktion im Überschuss bewerkstelligt, führte zu der Annahme, dass ihm ein gewisser enzymatischer Charakter zukommt. Zur näheren Charakterisierung des Mechanismus sollte im Folgenden auf Grundlage der vorherigen Ergebnisse der Einfluss des DAIP:Protease-Verhältnisses auf die Autolyse eingehender untersucht werden. DAIP wurde hierfür zunächst im 5-fachen Überschuss mit rBacillolysin bei 37 °C inkubiert, um den Abbau über SDS-PAGE zu verfolgen (Abb. 4.46, A).



**Abb. 4.46** Signifikanter Einfluss der DAIP-Konzentration auf die Autolyse von M4-Metalloproteasen bei pH 8. A, Proteinmuster von 10  $\mu$ M rBacillolysin behandelt mit 2.5  $\mu$ M DAIP (1:4) bei 37 °C nach den angegebenen Inkubationszeiten. B, Einfluss der DAIP-Menge (2-50  $\mu$ M, 1:5-5:1) auf die Autolysegeschwindigkeit von 10  $\mu$ M rBacillolysin nach 30 min bei 37 °C. C, induzierte Autolyse von 1  $\mu$ M rAureolysin in Anwesenheit von 0.063-2  $\mu$ M DAIP (1:16-2:1) nach 60 min bei 37 °C. D, 7.5  $\mu$ M Thermolysin (links) oder 3  $\mu$ M rThermolysin (rechts) wurden jeweils mit 0.2-10  $\mu$ M (1:5-2:1) bzw. 6  $\mu$ M DAIP (2:1) ( für 1-16 h gemeinsam bei 37 °C inkubiert. (\*) zusätzl. Vorinkubation mit 60  $\mu$ M Phosphoramidon für 15 min bei RT. Alle Untersuchungen erfolgten in 50 mM Tris mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$  bei pH 7.5. Die Auftrennung und Visualisierung erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung.



---

Es zeigte sich erwartungsgemäß die rapide Abnahme der Proteasebande, welche nach Verdopplung der DAIP-Konzentration bereits nach 10 min vollständig verschwunden war (vgl. Abb. 4.36, A). Entgegen der Erwartung führte eine weitere Erhöhung der DAIP-Menge nicht zu einer beschleunigten sondern reduzierten Autolyse im untersuchten Zeitraum (Abb. 4.46, B). Während bei einem molaren DAIP:Protease-Verhältnis von 1:5 nach einer halben Stunde die Bacillolysin-Bande vollständig verschwunden war, verlangsamte sich die Hydrolyse der Metalloprotease mit steigender DAIP-Konzentration. Durch Bacillolysin, welche gegenüber DAIP die sensitivste Protease darstellt, zeigte sich der Einfluss des Protein-Verhältnisses auf die Hydrolyse am eindrucksvollsten. Das in Relation zu DAIP vergleichbare Laufverhalten verhinderte jedoch die quantitative Auswertung der elektrophoretischen Experimente mit der M4-Metalloprotease aus *P. polymyxa*. Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit rAureolysin gemacht werden, welches bei DAIP-Überschuss keine Autolyse erkennen ließ, jedoch bei Unterschuss nach 30 min nicht mehr nachweisbar war (Abb. 4.46, C).

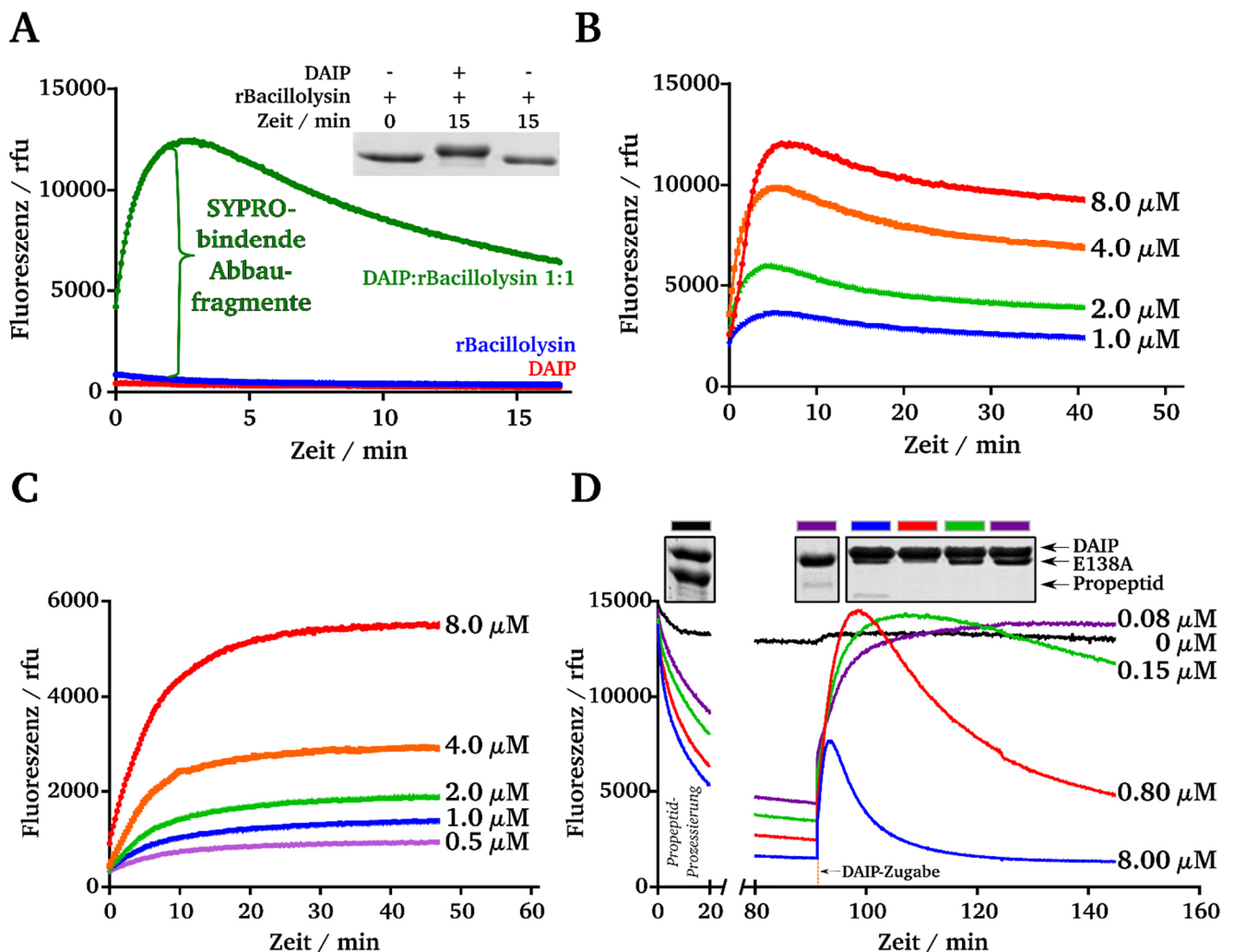
Erstaunlicherweise konnte die Autolyse von rAureolysin durch Zugabe des M4-Metalloproteaseinhibitors Phosphoramidon (mit \* gekennzeichnet) in den Ansatz mit der effektivsten DAIP-Konzentration ( $0.125\ \mu\text{M}$ ) fast vollständig unterbunden werden, was den autokatalytischen Verdau zusätzlich bestätigte.

Während sich der autolytische Effekt auf Bacillolysin und Aureolysin bereits durch Inhibitionskurven veranschaulichen ließ, zeigte die Vorinkubation bei Thermolysin bzw. Pseudolysin zumindest im untersuchten Zeitraum zunächst keinen Einfluss (vgl. Abb. 4.45). Eine verlängerte Inkubationszeit hingegen offenbarte jedoch auch für Thermolysin eine dem Bacillolysin ähnliche, wenn auch deutlich langsamer verlaufende Autolyse in Anwesenheit von DAIP (Abb. 4.46, D). Durch den signifikant langsameren Abbau konnte zudem herausgearbeitet werden, dass es offensichtlich für jede Zielprotease ein optimales Protein-Verhältnis für die Induktion der Autolyse zu geben scheint. Ist die DAIP-Konzentration hoch, wird die Protease lediglich „abgefangen“ und durch strukturelle Modifikation inhibiert (D,  $10\ \mu\text{M}$ ). Bei zu geringen Mengen an DAIP hingegen verläuft die Autolyse aufgrund der geringen Anzahl modifizierter Moleküle langsam, und eine Abnahme der Proteasebande oder -aktivität ist nicht nachweisbar (D,  $0.2\ \mu\text{M}$ ).

Im Zuge dieses Experiments wurde auch das rekombinant produzierte rThermolysin untersucht, welches durch Inkubation mit DAIP im Gegensatz zum kommerziellen Enzym erheblich schneller autolysierte. Analog zu rAureolysin konnte durch Zugabe von Phosphoramidon dem rapiden Abbau entgegengewirkt werden. Trotz der sonst ähnlichen Eigenschaften wie Temperaturstabilität und pH-Optimum (vgl. Tab. 4.6 und Abb. 7.7), setzte die rekombinante Protease das fluoreszierende Dipeptid *DabSFans* etwa 7-fach schneller um und war, möglicherweise aufgrund seiner höheren Aktivität, auch autolysesensitiver in Gegenwart von DAIP (nicht gezeigt). Demnach musste es produktions- und damit faltungsbedingt zwischen beiden Enzymen strukturelle Unterschiede geben, welche einerseits eine höhere Aktivität, aber andererseits eine geringere Stabilität zur Folge hatten (höhere Flexibilität).

Die Verfolgung der Autolyse über SDS-PAGE und das Ausbleiben signifikanter Hydrolyse-Fragmente erlaubten keine quantitativen Analysen oder die Bestimmung initialer Autolyse-Schnittstellen über Massenspektrometrie.

Mit SYPRO-Orange, welches in der Regel zur Untersuchung der Proteininstabilität eingesetzt wird, sollte im Folgenden versucht werden, die induzierte partielle Entfaltung der Proteasen nachzuweisen und näher zu charakterisieren.<sup>[212]</sup> Dabei zeigte sich, dass Bacillolysin den Merocyanin-Farbstoff ausschließlich nach Modifikation durch DAIP adsorbierte und damit eine semiquantitative Verfolgung der Autolyse zuließ (Abb. 4.47).



**Abb. 4.47 Nachweis der DAIP-vermittelten Proteolyse von Bacillolysin durch SYPRO-Orange bei pH 7.5 (publiziert in Fiebig *et al.*, 2018).<sup>[226]</sup>** A, Verfolgung der Entstehung von SYPRO-Orange-bindenden Bacillolysin-Fragmenten durch Inkubation von 8  $\mu\text{M}$  der Zielprotease mit 8  $\mu\text{M}$  DAIP. B, Autolyse von rBacillolysin in den angegebenen Konzentrationen durch 4  $\mu\text{M}$  DAIP. C, Abbau der angegebenen Konzentrationen von rBacillolysin-E138A durch minimale Spuren an Trypsin aus der Propeptid-Prozessierung nach Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  DAIP. D, Propeptid-Prozessierung und Hydrolyse von *Pro*-E138A (8  $\mu\text{M}$ ) durch die angegebenen Trypsin-Konzentrationen. Die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  DAIP nach 90 min ist durch einen Pfeil markiert. Insert: Proteinmuster nach 0 min (schwarze/r Linie/Balken), 90 min (lila vor DAIP-Zugabe), 93 min (blau), 98 min (rot), 105 min (grün) und 110 min (lila). Die durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit 2xSYPRO-Orange in 50 mM Tris pH 7.5 und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 30 °C. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 580 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  485 nm) bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

Während die Fluoreszenz von SYPRO-Orange bei Inkubation mit DAIP oder der untersuchten Protease niedrig blieb (Abb. 4.47, A, rote/blau Linie), ließ sich bei Zugabe von DAIP zu Bacillolysin-Farbstoff-Mischungen ein steiler Anstieg der Emission bei 580 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  485 nm) beobachten (Abb. 4.47, A, grüne

---

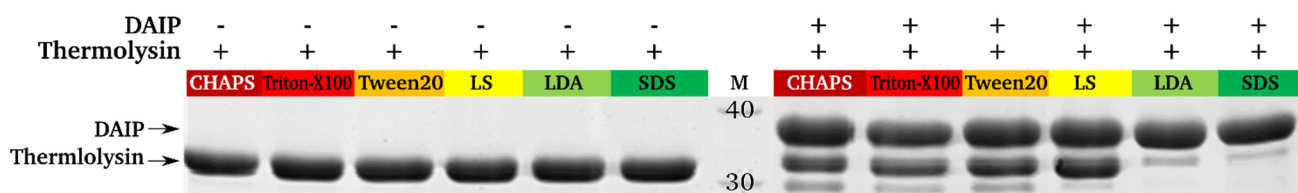
Linie). Im Vergleich dazu blieb bei Inkubation des nachweislich modifizierten, jedoch langsam hydrolysierenden Thermolysins mit DAIP die Fluoreszenz unverändert. Der Verlauf bei Bacillolysin gab daher weniger Einblick in die Entfaltung, sondern vielmehr in die Autolyse des Enzyms durch Bindung des umgebungssensitiven Fluorophors an entstehende Hydrolyse-Fragmente. Das Emissionsmaximum wurde dabei relativ schnell erreicht und signalisierte dabei wahrscheinlich die Spitze der Primärfragment-Bildung. Die darauffolgende Abnahme der Fluoreszenzintensität wies hingegen auf den zweiten Teil der Autolyse hin, nämlich die Spaltung der Fragmente in kleinere Peptide, welche nicht mehr in der Lage waren SYPRO-Orange zu binden. Die Höhe des Signals war zwar von der eingesetzten Proteasemenge abhängig, die Korrelation von Konzentration und Fluoreszenzintensität reichte jedoch für kinetische Untersuchungen nicht aus (Abb. 4.47, B). Neben dem aktiven Enzym wurde ebenfalls die Bildung und Hydrolyse von Primärfragmenten der nicht-funktionellen Variante rBacillolysin-E138A untersucht. Wie bereits gezeigt, verursachten bereits minimale Spuren der Propeptid-prozessierenden Protease Trypsin, die nicht abgetrennt werden konnten, einen langsamen Abbau des DAIP-modifizierten Enzyms (vgl. Abb. 4.36, A). Dies äußerte sich durch einen langsamen hyperbolischen Anstieg der Fluoreszenz hin zu einem Plateau, dessen Niveau einzig von der eingesetzten Zielenzym-Konzentration abhing (Abb. 4.47, C). Durch die extrem niedrige Konzentration der externen Protease zeigten die unterschiedlichen Plateaus jeweils Gleichgewichte zwischen der Entstehung und dem Abbau SYPRO-Orange-bindender E138A-Fragmente an.

Zur Verifizierung dieser Beobachtungen wurde daher die Prozessierung und anschließende Hydrolyse von *Pro*-rBacillolysin-E138A durch unterschiedliche Mengen an Trypsin untersucht (Abb. 4.47, D). SYPRO-Orange-Ansätze mit dem nicht-funktionellen Proenzym zeichneten sich durch eine hohe Ausgangsfluoreszenz aus (Abb. 4.47, D, schwarze Linie), welche den hydrophoben Charakter des Propeptids widerspiegelte (vgl. Abb. 4.25, B). Die Prozessierung des Proenzyms durch Trypsin war dabei durch die Abnahme der Emissionsintensität hin zu einem unteren Niveau gekennzeichnet, welches den nahezu kompletten Abbau des Propeptids markierte. Die anschließende Zugabe von DAIP führte in allen Ansätzen zu einem rapiden Anstieg der Fluoreszenz ähnlich wie bei aktivem Bacillolysin (Abb. 4.47, B und D). Die primäre Spaltung des DAIP-modifizierten Enzyms und der entstehenden farbstoffbindenden Fragmente war bei niedrigen Trypsin-Konzentrationen erneut im Gleichgewicht (80 nM, lila Linie). Eine geringe maximale Signalthöhe und schnelle Abnahme der Fluoreszenz waren hingegen charakteristisch für hohe Trypsin-Konzentrationen (8  $\mu$ M, blaue Linie) und zeigten damit die schnelle Hydrolyse des gesamten Proteins.

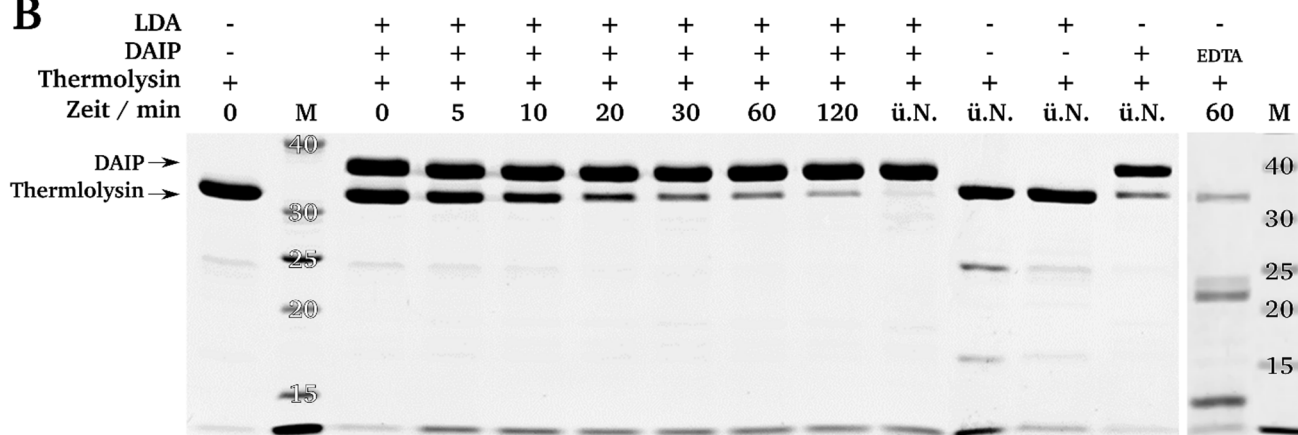
Der SYPRO-Orange-Assay stellt somit unter Verwendung geeigneter Substrate eine hochsensible Methode zum Nachweis geringster Proteasemengen dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die induzierte Hydrolyse des Zielproteins auch von externen Proteasen bewerkstelligt werden kann und somit nur durch die konformationelle Freilegung sensibler Peptidbindungen zu erklären ist.

Auch wenn Pseudolysin unter den getesteten Bedingungen keiner Autolyse unterlag, zeigten Untersuchungen mit dem nicht-funktionellen Enzym in Anwesenheit externer Proteasen, dass DAIP doch einen proteolytischen Abbau des Enzyms verursachen kann. Dieser Effekt wird durch Reduktion der stabilisierenden Disulfidbrücken des Enzyms verstärkt, wie Versuche mit Trypsin zeigten (vgl. Abb. 7.8). Weiterhin konnten aufschlussreiche Einblicke in den Verlauf der Autolyse gewonnen werden. Der von der Trypsin-Konzentration unabhängige steile Anstieg und die offensichtlich stark konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz gaben Hinweise darauf, dass jedes modifizierte Zielproteasemolekül zunächst primär gespalten wird, bevor die sekundäre Hydrolyse der Fragmente einsetzt.

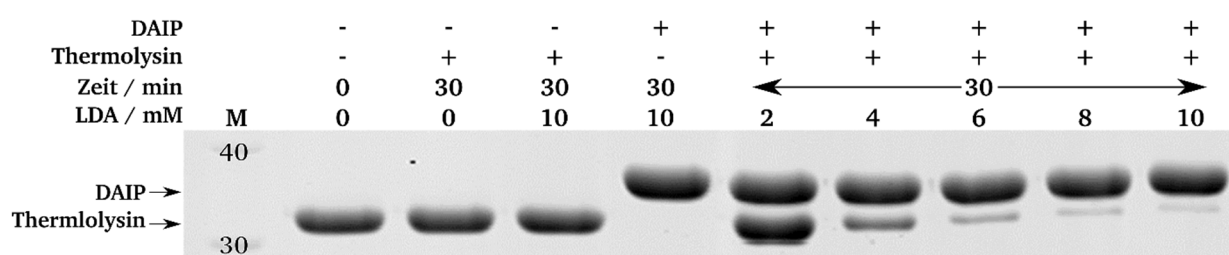
**A**



**B**



**C**



**Abb. 4.48 Verstärkung der DAIP-vermittelten Autolyse von Thermolysin durch amphiphile Substanzen (publiziert in Fiebig *et al.*, 2018).** <sup>[226]</sup> Zur Charakterisierung des Einflusses amphiphiler Substanzen wurden Ansätze mit 12-15  $\mu$ M Thermolysin und DAIP in einem äquimolaren Verhältnis bis zu 16 h (ü. N.) bei 37 °C in 50 mM Tris pH 8.0 und 5 mM  $\text{CaCl}_2$  inkubiert. A, Ansätze mit 10 mM der angegebenen Detergenz nach 1 h (LS: N-Lauroylsarcosin; LDA: N-Lauroylamido-N',N'-dimethylaminopropan). B, Ansätze mit 4 mM LDA zu den angegebenen Zeiten. Das Fragmentierungsmuster der EDTA-vermittelten Autolyse (10 mM) von 15  $\mu$ M Thermolysin nach 1 h ist rechts dargestellt. C, Ansätze mit den angegebenen LDA-Konzentrationen nach 30 min. Die Reaktionsansätze wurden bei 95 °C durch Denaturierung abgestoppt und bis zur Auftrennung über SDS-PAGE (12.5%) bei -20 °C gelagert.

Im Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, weshalb die Autolyse von Thermolysin trotz struktureller Modifikation durch DAIP im Vergleich zu Bacillolysin deutlich langsamer verläuft (vgl. Abb. 4.45 und Abb. 4.46). Unter der Vielzahl von Streptomyceten produzierten Sekundärmetaboliten

---

befinden sich auch amphiphile Moleküle wie Daptomycin oder Siolipin A, die das Potential haben, Proteinstrukturen zu verändern. [228, 229]

Da die Isolation und der Bezug entsprechender Substanzen aus *Streptomyces* sp. im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, sollte der Einfluss vergleichbarer Detergenzien auf die Induktion der Thermolysin-Autolyse untersucht werden. Dabei zeigte der Großteil der untersuchten Substanzen bei 10 mM eine signifikante Beschleunigung der Thermolysin-Autolyse, jedoch nur in Anwesenheit von DAIP (Abb. 4.48, A). Der Effekt der Detergenzien Natriumdodecylsulfat (SDS) und N-(3-Dimethylamino)-propyllauramid (N-Lauroylamido-N',N'-dimethylaminopropan, LDA) war jedoch am größten und äußerte sich durch einen fast vollständigen Abbau des Enzyms im untersuchten Zeitraum. Durch Reduktion der eingesetzten Detergenzien zeigte sich, dass der Einfluss konzentrations- und zeitabhängig ist. Bereits 4 mM LDA stellten eine angemessene Konzentration dar, um die Autolyse von Thermolysin erheblich zu beschleunigen, wie ein direkter Vergleich mit der Kontrolle ohne Detergenz offenbarte (Abb. 4.48, B und C).

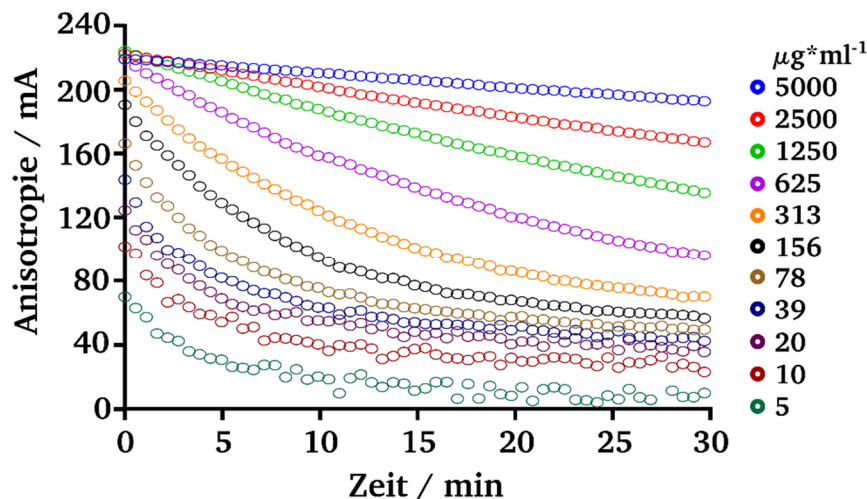
Wie bereits erwähnt, zeigen DAIP-modifizierte M4-Proteasen kein signifikantes Aufkommen von Hydrolysefragmenten während der induzierten Autolyse. Thermolysin stellt hierbei jedoch eine Besonderheit dar, da es, wie Fassina *et al.*, 1986, zeigen konnten, bei EDTA-vermittelter autolytischer Spaltung in der Regel in drei definierte Fragmente zerfällt. [230] DAIP verursachte bei Thermolysin hingegen ein davon abweichendes Fragmentierungsmuster und deutete damit auf die Exposition anderer Peptidbindungen als bei EDTA hin (Abb. 4.48, B).

#### **4.2.9. Kinetisches Model des DAIP-Katalyse-Mechanismus**

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Autolyse waren alle semi-quantitativer Natur und ließen somit die zugrundeliegenden kinetischen Parameter der DAIP-Interaktion im Unbekannten. Das größte Problem stellte die Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Katalysatoren dar, von denen einer das Proteasemolekül in ein Substrat für den Zweiten umwandelt. Zum einen bestimmt die Menge an DAIP den Anteil modifizierter Zielproteine, und zum anderen ungebundene Proteasemoleküle mit unbekannter Aktivität die Abbaugeschwindigkeit. Diese beiden hintereinander ablaufenden Reaktionen schlossen bei den Studien mit SYPRO-Orange eine quantitative Auswertung aus, da sie sich nicht getrennt untersuchen ließen (vgl. Abb. 4.47, D). Die DAIP-Katalyse, nämlich die strukturelle Veränderung von E138A nach Komplexbildung, sollte deshalb bei hoher Trypsinkonzentration untersucht werden, um die Umsatzgeschwindigkeit in Relation zu den E138A- und DAIP-Konzentrationen betrachten zu können. Zunächst wurde E138A mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bis zu einem Markierungsgrad (DOL) von eins bis zwei konjugiert (E138A-FITC). Eine Änderung der Fluoreszenzpolarisation erlaubte die Verfolgung der DAIP-vermittelten Fragmentierung durch Trypsin. Zur Validierung des Assays wurde zunächst die Hydrolyse des unspezifischen Substrats FITC-Casein durch Trypsin untersucht (Abb. 4.49). Dabei zeigte sich erwartungsgemäß der Abbau des Substrats über



die Abnahme der Fluoreszenzpolarisation. Da es sich bei der Fluoreszenzpolarisation um ein relatives Signal handelt, war bei höheren Caseinkonzentrationen eine geringe und bei niedrigen eine höhere Anisotropieabnahme zu beobachten. Die relative Abnahme der Anisotropie war somit umgekehrt proportional zur eingesetzten Substratmenge.



**Abb. 4.49 Validierung des Fluoreszenzpolarisations-Assays durch Trypsin-vermittelte Hydrolyse von FITC-Casein bei pH 7.5.** Trypsin (0.1  $\mu\text{M}$ ) wurde mit 5-5000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  FITC-Casein in 50 mM Tris pH 7.5 mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 30 °C vereint und die Änderungen der Fluoreszenzpolarisation bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  485 nm) über die Zeit bestimmt.

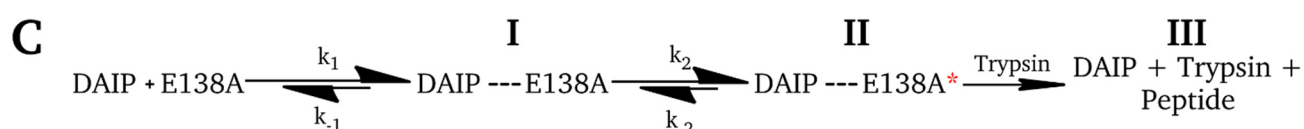
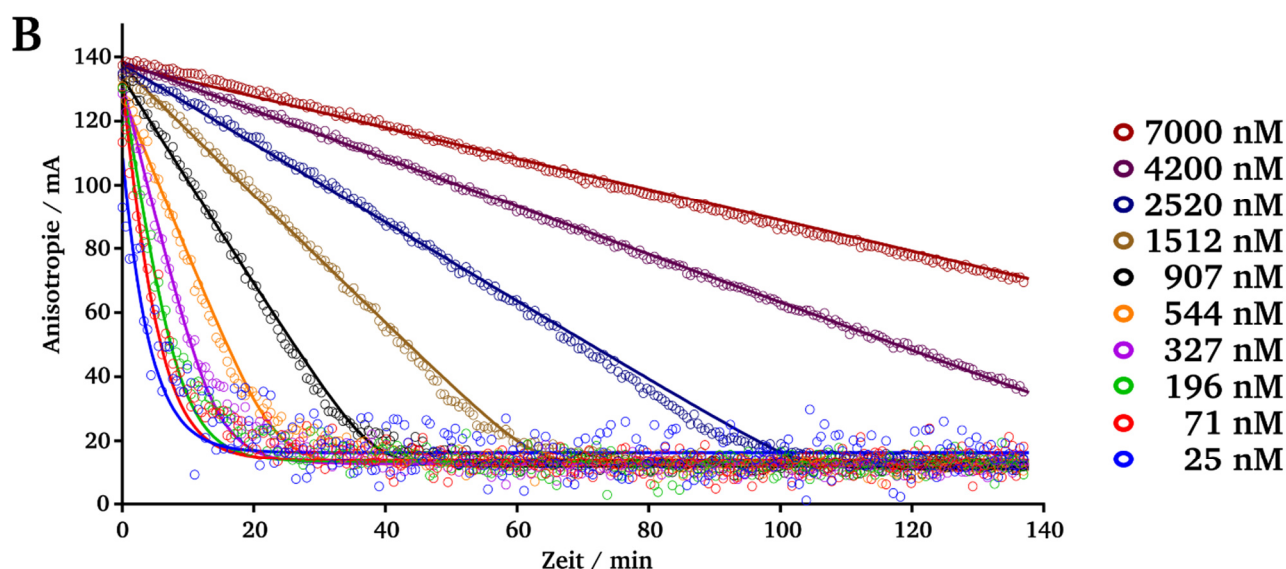
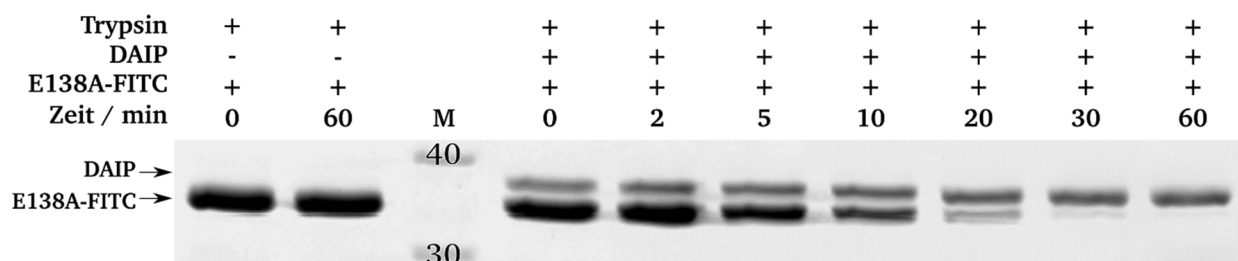
Wie sich zeigte, ging auch die Hydrolyse von DAIP-modifiziertem E138A-FITC durch Trypsin analog mit der Abnahme der Anisotropie einher (Abb. 4.50, A und B). Dabei korrelierten die Änderungen mit den eingesetzten Mengen an DAIP bei konstanten E138A-FITC-Konzentrationen und umgekehrt (vgl. Abb. 7.9). Unter Berücksichtigung des besonderen *Readouts* wurde mithilfe des biochemischen Simulationsprogramms COPASI (COmplex PATHway SIMulator) und der generierten Daten ein kinetisches Modell für die DAIP-induzierte Modifikation entwickelt. <sup>[210]</sup> Dieses gab Hinweise auf einen dreistufigen Mechanismus, bestehend aus (I) Proteinassoziation von DAIP und der Protease, (II) struktureller Modifikation und (III) abschließender Hydrolyse von modifizierten E138A durch Trypsin (Abb. 4.50, C). Da der erste Reaktionsschritt, die Formierung/Bildung eines Komplexes aus DAIP und E138A, sehr schnell und nicht geschwindigkeitsbestimmend war, konnten die partiellen Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_{-1}$  nicht exakt ermittelt werden.

Die Dissoziationskonstante des initialen Komplexes ( $K_{d/-1}$ ), welche sich aus dem Verhältnis  $k_{-1}/k_1$  ergibt, lag jedoch mit 17 nM im Bereich der ITC-Messung (vgl. Abb. 4.43, B). Der langsamere zweite Schritt, die Änderung der Proteasestruktur durch DAIP, wurde durch die partielle Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion ( $k_2$ ) von  $5.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bestimmt, was einer Halbwertszeit von etwa 2 min entsprach ( $\ln 2/k_2$ ). Demnach war innerhalb dieser Zeit die Hälfte der E138A-Moleküle so durch DAIP modifiziert, dass sie von Trypsin schlussendlich abgebaut werden konnten.

Durch den umgehenden Abbau des modifizierten E138A-Moleküls nach seiner Entstehung durch Trypsin konnten die partielle Geschwindigkeitskonstante  $k_{-2}$  der Rückreaktion und damit auch die Gleichgewichtskonstante  $K_2$  nicht hinreichend bestimmt werden. Die ermittelte  $K_d$  ließ jedoch den

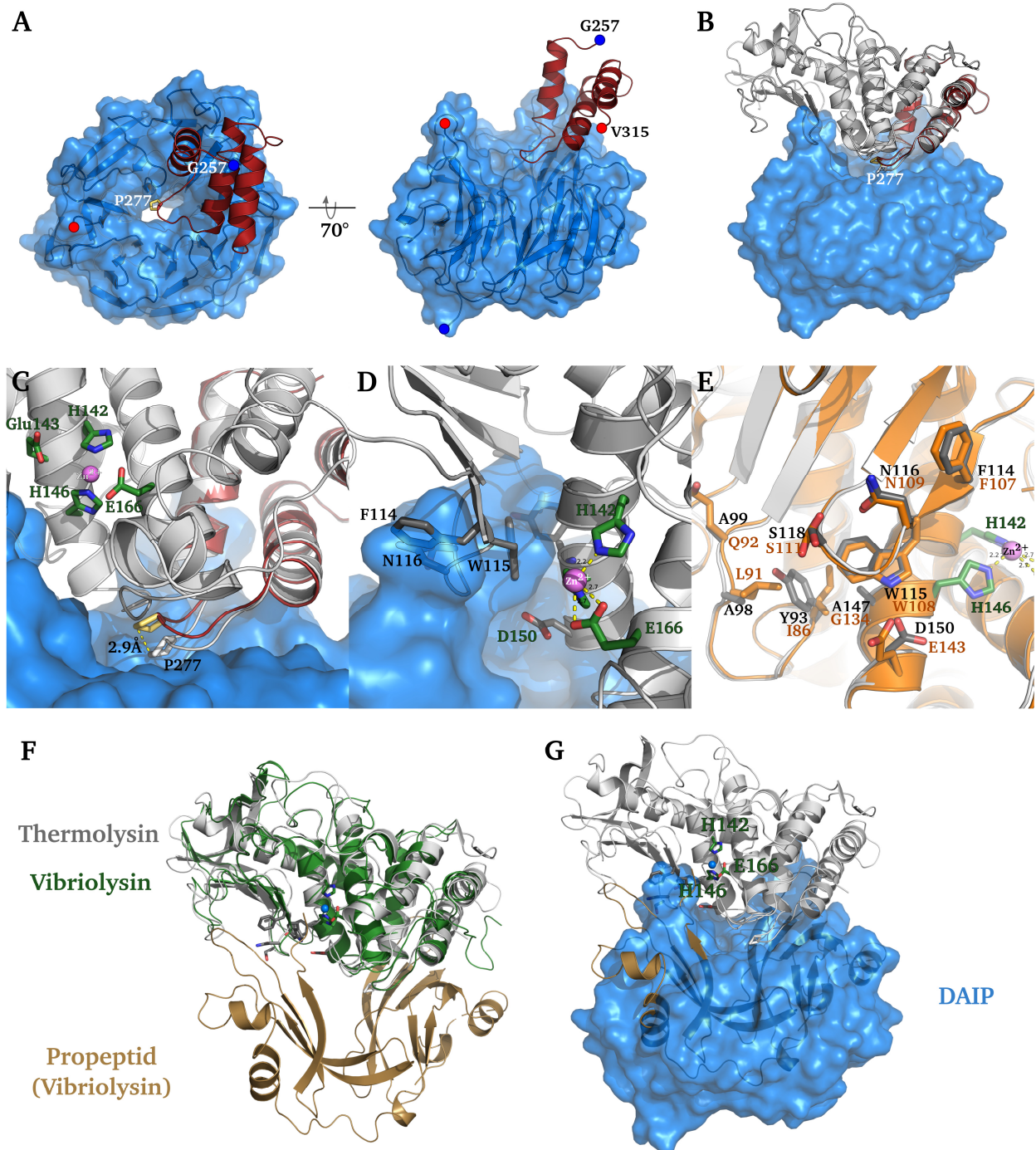


# A



#### 4.2.10. Strukturaufklärung eines Komplexes von DAIP mit dem C-terminalen Fragment von Thermolysin

114



**Abb. 4.51** Das Dispeaseautolyse-induzierende Protein im Komplex mit dem C-terminalen Fragment von Thermolysin. (publiziert in Fiebig *et al.*, 2018).<sup>[226]</sup> A, Auf- und Seitenansicht des über Röntgenstrukturanalyse gelösten Komplexes (PDB ID: 6FHP). DAIP ist als transparenter Oberflächen-Cartoon blau und das C-terminale Fragment von Thermolysin (CTF, Gly257-Val315) als Cartoon dunkelrot eingefärbt. N- und C-Termini sind jeweils mit blauen bzw. roten Kreisen hervorgehoben. B, Überlagerung des DAIP-gebundenen CTFs mit der Struktur des vollständigen Thermolysins (PDB ID: 2TLX, grau). DAIP (Oberflächenillustration, blau) und das reife Thermolysin zeigen bei der Überlagerung Strukturüberlappungen (*clashes*). C, Ausschnitt der Überlagerung aus B. Der Thermolysin-Loop, welcher Pro277 (gelb) enthält, ist beim CTF im Vergleich zum reifen Enzym um 2.9 Å verschoben. Das Aktivzentrum von Thermolysin (His142, Glu143, His146, Glu166) erscheint weiterhin zugänglich für kleine Moleküle. D, Ausschnitt des Bereichs in dem DAIP und Thermolysin zusammenstoßen. Die betreffenden Aminosäureseitenketten von Thermolysin zwischen Phe114 und Ser118 sind als *Sticks* herausgestellt. Zur Orientierung sind die Seitenketten des Aktivzentrums (grün) und das koordinierte Zn<sup>2+</sup> (lila) hervorgehoben. E, leicht abgewandelte Perspektive der zusammenstoßenden Strukturbereiche im Vergleich zu D. Zusätzlich wurde die Tertiärstruktur von Bacilolysin (Gentlyase, PDB ID: 4GER) in einer Überlagerung mit dem reifen Thermolysin dargestellt (orange) und die strukturell äquivalenten Seitenketten ebenfalls hervorgehoben. F, Überlagerung des DAIP-Thermolysin-Komplexes mit Pro-Vibriolysin MCP-02. Thermolysin (grau, PDB ID: 2TLX) zeigt eine hohe Homologie bei der Überlagerung mit der Struktur des inaktiven Proenzym von *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 (grün, PDB ID: 3NQY). Das Propeptid wurde zur besseren Übersicht in braun dargestellt. G, relative Überlagerung des Modell-Komplexes aus Thermolysin (grau) und DAIP (blau) mit dem Propeptid von Vibriolysin (braun). DAIP und das Propeptid besetzen theoretisch die gleiche Interaktionsfläche auf dem reifen Enzym.

---

Wegen der langsamen Autolyse wurde dafür Thermolysin ausgewählt, das nach der Mischung mit äquimolarem DAIP durch präparative GPC gereinigt und mittels Ultrafiltration konzentriert wurde. Um die Autolyse weiter zu verlangsamen, wurde die Kristallisation bei 4 °C durchgeführt (vgl. Abb. 4.48, B). Wie auch schon bei der Strukturaufklärung von DAIP erfolgten die Kristallisation, Röntgenbestrahlung und Strukturanalyse am HZI in Braunschweig durch Dr. Stefan Schmelz und Dr. Andrea Scrima mit SEC-gereinigtem Thermolysin-DAIP-Komplex.

Dabei zeigte sich, dass auch eine Temperatur von 4 °C DAIP-modifiziertes Thermolysin über den langen Kristallisationszeitraum vor der Autolyse nicht schützte. Die aufgeklärte Komplex-Struktur zeigte dabei auf der Oberseite des *seven-bladed  $\beta$ -Propellers* nur das C-terminale Fragment von Thermolysin (CTF, Gly257-Val315 (Abb. 4.51, A). Aufgrund der Größe der Interaktionspartner umfasste die Grenzfläche etwa 700 Å<sup>2</sup>, und die beiden Komplexe in der asymmetrischen Einheit enthielten 11 bzw. 13 Wasserstoffbrückenbindungen. Bis auf kleinere Unterschiede im *Loop* Glu239-Gly248 (0.5-1.3 Å) zeigte der Komplex keine größeren Abweichungen zur zuvor gelösten Struktur von freiem DAIP (rmsd: 0.23 Å, PDB ID: 5FZP).

Weiterhin ließ sich die vollständige Struktur von Thermolysin (PDB ID: 2TLX) mit dem kristallisierten C-terminalen Fragment überlagern (RMSD: 0.3 Å), was analog zu DAIP, bis auf eine kleine Verschiebung in der *Loop*-Region um Pro277 (2.9 Å), keine signifikanten strukturellen Veränderungen zum ungebundenen Enzym anzeigte (Abb. 4.51, B und C). Bemerkenswerterweise blieb das Aktivzentrum des vollständigen Thermolysins (His142, Glu143, His 146 und Glu166) im Komplex-Model mit DAIP zumindest für kleine Substrate weiterhin zugänglich. Dies deckte sich mit der beobachteten reduzierten Aktivität von gebundenem Thermolysin im Vergleich zum freien Enzym (vgl. Abb. 4.45, C).

Trotz der hohen Übereinstimmung des überlagerten vollständigen Enzyms mit dem kristallisierten Fragment zeigten sich, vor allem im Thermolysin-*Loop* zwischen Phe114 und Ser118 in der Nähe des Aktivzentrums, diverse Strukturüberlappungen (*clashes*) mit DAIP (Abb. 4.51, D). Die hohe strukturelle Homologie mit Thermolysin legt nahe, dass auch andere M4-Metalloproteasen wie Bacillolysin in ähnlicher Weise mit DAIP interagieren. Entsprechend zeigte eine Überlagerung mit Gentlyase (PDB ID: 4GER) ähnliche *clashes* in entsprechenden Bereichen (Abb. 4.51, E). Da zwei Moleküle jedoch nicht den gleichen Raum besetzen können, muss nach den hypothetischen Modellen eine mit der Komplexbildung einhergehende strukturelle Veränderung von DAIP oder der Protease stattfinden.  *$\beta$ -Propeller-Proteine* besitzen in der Regel eine relativ starre Struktur, was sich auch anhand niedriger B-Faktoren des DAIP erkennen lässt. Es erscheint daher als unwahrscheinlich, dass sich DAIP durch größere konformationelle Veränderungen an die native Zielprotease anpasst. Naheliegender ist, dass bei der Bildung des Komplexes, wie bereits mit anderen Methoden oben gezeigt, die Protease jeweils einer strukturellen Deformation unterliegt, welche die Autolysebereitschaft erhöht.

Die strukturelle Überlagerung mit *Pro*-Vibriolysin (PDB ID: 3NQY) zeigte weiterhin, dass DAIP in gebundener Form mit dem Propeptid inkonsistent überlappt (Abb. 4.51, F und G). Daraus resultierte, dass die Anwesenheit der gebundenen Prodomäne eine gleichzeitige Interaktion von DAIP mit dem reifen Enzym ausschließt. Das erstellte Struktur-Modell bestätigte damit die ITC-Untersuchungen, welche keine Komplexbildung zwischen der nicht-funktionellen Proenzym-Variante *Pro*-rBacillolysin-E138A und DAIP feststellte (vgl. 4.2.6 und Abb. 7.5).

#### 4.2.11. Wirkungsprofile diverser DAIP-Varianten auf M4-Metalloproteasen

Im Zuge der Charakterisierung des Katalysemechanismus von DAIP wurden bereits vor Aufklärung der Struktur des Fragment-Komplexes mit Thermolysin diverse Varianten des inaktivierenden Proteins rekombinant hergestellt. Diese basierten zu Beginn der Untersuchungen ohne Kenntnis der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren auf hypothetischen Annahmen des Wirkmechanismus. Bei der Aufklärung der Struktur des freien DAIPs (PDB ID: 5FZP) ließen sich bereits zwei gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen identifizieren. Deren Effekte auf Bindung und Katalyse wurden im Folgenden durch Austausch der beteiligten Aminosäuren (Glu247, Asp267, Glu272, Asp322, Glu343) näher untersucht.

Dabei zeigte sich aufgrund der mit dem *Wildtyp* vergleichbaren effektiven Konzentrationen, dass keines der beiden DAIP-gebundenen Metallionen an der Katalyse beteiligt sein sollte (nicht dargestellt). Vielmehr ließ sich erkennen, dass die Ionen wahrscheinlich eine stabilisierende Funktion einnehmen, wie anhand eines reduzierten Schmelzpunktes (Tab. 4.7) sowie einer gesteigerten Empfindlichkeit von DAIP gegenüber proteolytischem Abbau durch bspw. Thermolysin hervorging (Abb. 7.10).

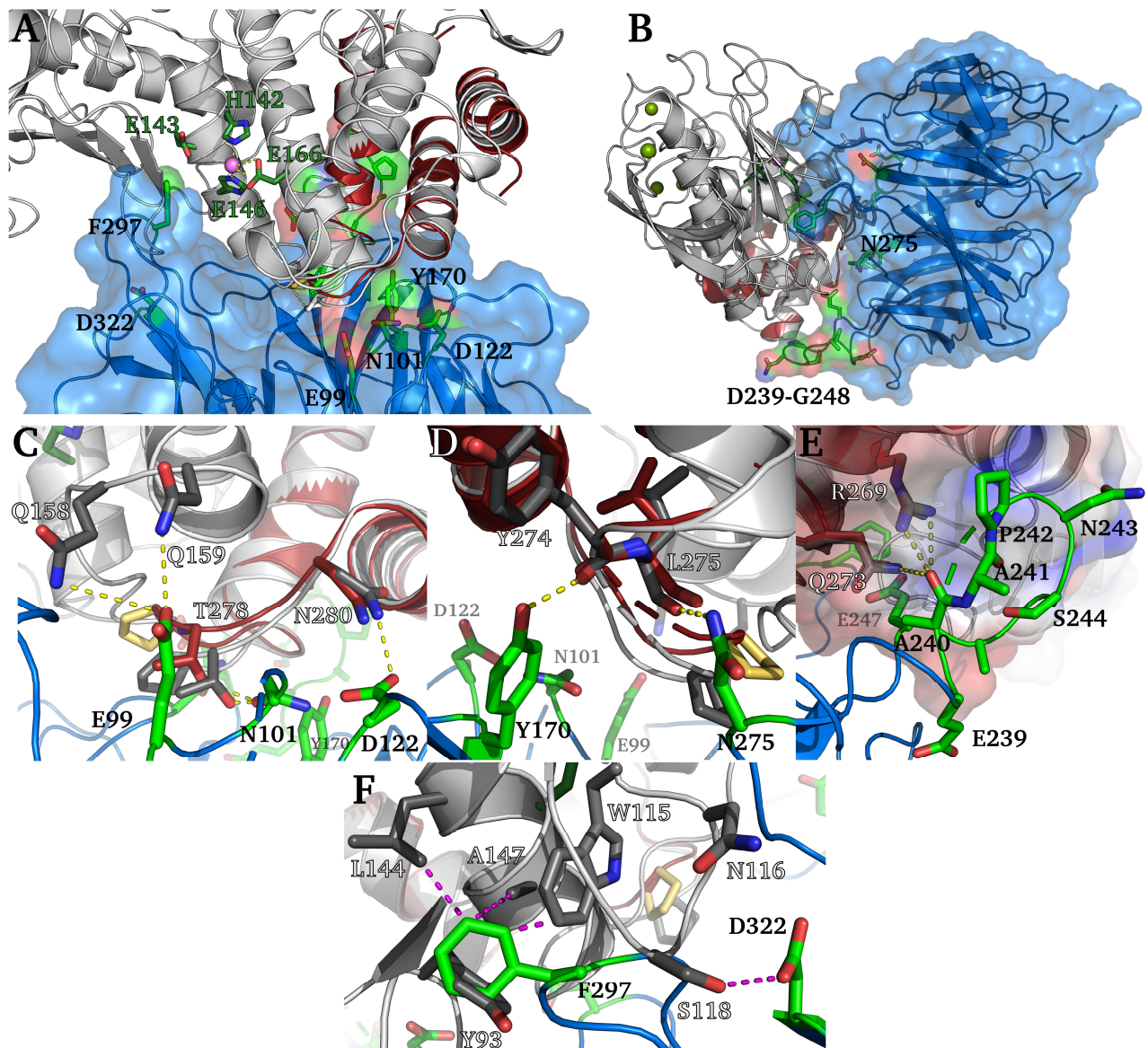
Tab. 4.7 Ausbeute, Schmelzpunkte und effektive Konzentrationen der aus dem Komplex abgeleiteten DAIP-Varianten

DAIP-Variante	Ausbeute <sup>a</sup> / mg*l <sup>-1</sup>	Schmelzpunkt <sup>b</sup> / °C	DabSFans-Hydrolyse <sup>c</sup> (EC <sub>50</sub> ohne Vorinkubation) / DAIP:Protease			
			Bacillolysin	Thermolysin	Aureolysin	Pseudolysin
<i>wt</i>	25.0	56.5	1.18±0.06	1.20±0.04	13.15±0.48	0.63±0.02
E99A	19.0	54.0	1.33±0.05	1.10±0.12	19.15±2.32	1.04±0.07
N101A	21.6	55.4	0.90±0.04	1.07±0.10	21.25±3.91	0.83±0.03
D122A	14.2	55.4	0.98±0.14	1.73±0.14	11.38±1.33	0.76±0.03
Y170A	10.7	54.3	1.03±0.06	n.b.	n.b.	0.65±0.04
Δ239-248	12.3	50.9	0.57±0.01	n.b.	n.b.	0.59±0.02
N275A	19.4	48.7	0.85±0.06	1.07±0.07	n.b.	0.77±0.06
F297A	17.3	54.4	0.58±0.01	n.b.	>100	0.71±0.09
D322A	10.5	50.2	1.63±0.01	1.12±0.07	>90	0.76±0.05

<sup>a</sup> gereinigtes Protein pro Liter Kulturbrühe; <sup>b</sup> ermittelt über intrinsische Fluoreszenz in 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl (nanoDSF:  $\lambda_{\text{ex}}$  280 nm,  $\lambda_{\text{em},1}$  330 nm,  $\lambda_{\text{em},2}$  350 nm), N=2. <sup>c</sup> 50 nM rBacillolysin, 5 nM Thermolysin, 4.5 nM rAureolysin und 6.25 nM Pseudolysin wurden mit DAIP in 50 mM Tris pH 8.0 mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$  entsprechend vereinigt und umgehend die Restaktivität durch *DabSFans*-Hydrolyse bestimmt. Die nichtlineare Regression erfolgte mit GraphPad 5 (n=3). n.b.: nicht bestimmbar

Durch die Aufklärung der Struktur des Komplexes aus DAIP mit dem C-terminalen Thermolysin-Fragment und dem daraus abgeleiteten Modell konnten nun erstmals Einblicke in die potentielle Interaktionsfläche beider Proteine erhalten werden (vgl. Abb. 4.51, B).

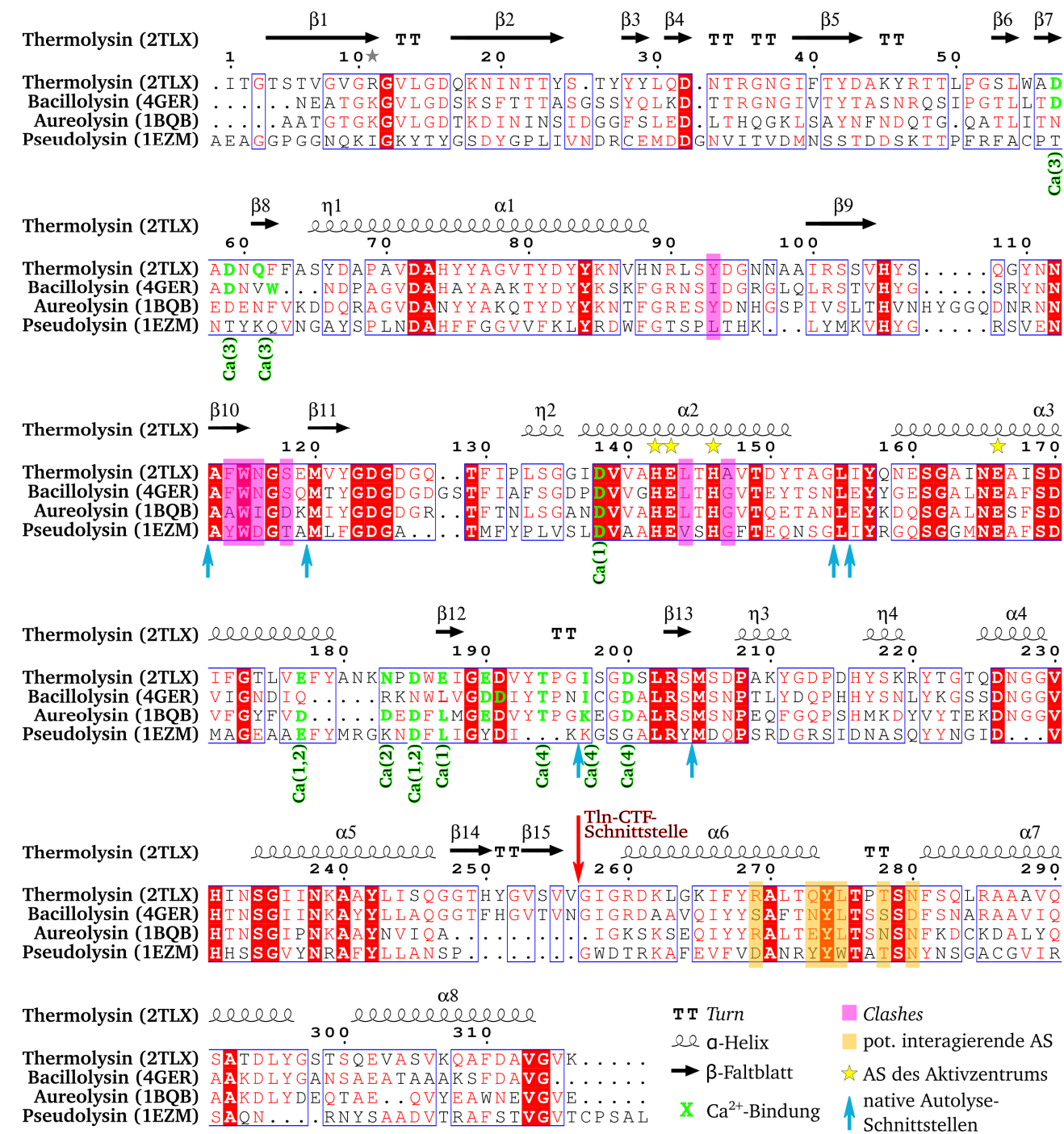




**Abb. 4.52** Potentielle Interaktionspunkte des DAIP bei der Interaktion mit der M4-Metalloprotease Thermolysin. A/B, Darstellung des Komplex-Interfaces zwischen DAIP (blau) und dem kristallisierten C-terminalen Fragment (dunkelrot) mit überlagertem Thermolysin (PDB ID: 2TLX, grau) wie in Abb. 3.51 (PDB ID: 6FHP). Die Aminosäuren des Aktivzentrums (His142, Glu143, His146, Glu166) und das katalytische  $\text{Zn}^{2+}$  sind zur besseren Orientierung grün und lila hervorgehoben. Die für eine Interaktion in Betracht gezogenen Aminosäuren E99, N101, D122, Y170, E239-E247, N275, F297 und D322 des DAIP sind in grün dargestellt. C, Nahaufnahme der Interaktionsfläche bei E99, N101 und D122 mit potentiell ausbildbaren Wasserstoffbrückenbindungen (gelb gestrichelt) zu den Aminosäuren Q158/Q159, T278 bzw. N180 an der Thermolysin-Oberfläche. D, Nahaufnahme des Interfaces bei Y170 und N275 wie in (C) mit potentiellen H-Brücken zum Proteinerückgrat von Thermolysin bei Y274 und L275. E, Nahaufnahme des Interfaces des DAIP-Loops E239-E247 analog zu (C). F, Nahaufnahme des *clashing* Loops der *Sm*-TG-Glutaminbindestelle Q298 mit herausgestelltem F297 und D322. Ein sehr geringer Abstand der Seitenketten, der zu Überlappungen führt, ist lila gestrichelt hervorgehoben.

Unter der Annahme einer zwar wegen diverser Strukturkonflikte nicht identischen, aber doch sehr ähnlichen Orientierung und Bindung der Zielproteasen an DAIP wurden im Folgenden sechs potentiell an der Interaktion beteiligte Aminosäuren auf Seiten des inaktivierenden Proteins identifiziert (Abb. 4.52, A und B).

Als vielversprechende Kandidaten für einen Austausch erwiesen sich die DAIP-Reste Glu99, Asn101 und Asp122, welche aufgrund ihres Abstands die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den hervorgehobenen Aminosäuren von Thermolysin möglich erscheinen ließen (Abb. 4.52, C, gelb gestrichelt). Im Gegensatz dazu erfolgt die Interaktion der Aminosäuren Tyr170 und Asn275 von DAIP



**Abb. 4.53** Potentielle Interaktionspunkte der DAIP-Bindung sind unter den M4-Zielproteasen größtenteils konserviert. Sequenzalignment von Thermolysin (PDB ID: 2TLX), Bacilloolysin (PDB ID: 4GER), Aureolysin (PDB ID: 1BQB), und Pseudolysin (PDB ID: 1EZM). Die Nummerierung und Darstellung von Sekundärstrukturelementen erfolgte angelehnt an Thermolysin. Partiell- und hochkonservierte Aminosäuren sind jeweils rot bzw. mit rotem Hintergrund hervorgehoben. Die Ca<sup>2+</sup>-bindenden Aminosäuren wurden entsprechend farblich in grün gekennzeichnet. Die Kennzeichnung der nativen Autolyseschnittstellen erfolgte auf Basis der von Fassina *et al.*, 1986, und van der Burg *et al.*, 1990, identifizierten Peptidbindungen.<sup>[230, 231]</sup> Die Darstellung der potentiell mit DAIP interagierenden Aminosäuren erfolgte mit lila und gelben Rechtecken.

Interessanterweise sind jedoch gerade die involvierten Aminosäuren von Thermolysin, nämlich Tyr274 und Leu275, bei den in dieser Arbeit untersuchten M4-Metalloproteasen hoch konserviert (Abb. 4.53), was sich jeweils auch in einer ähnlichen Ausrichtung des Proteaserückgrats äußert.



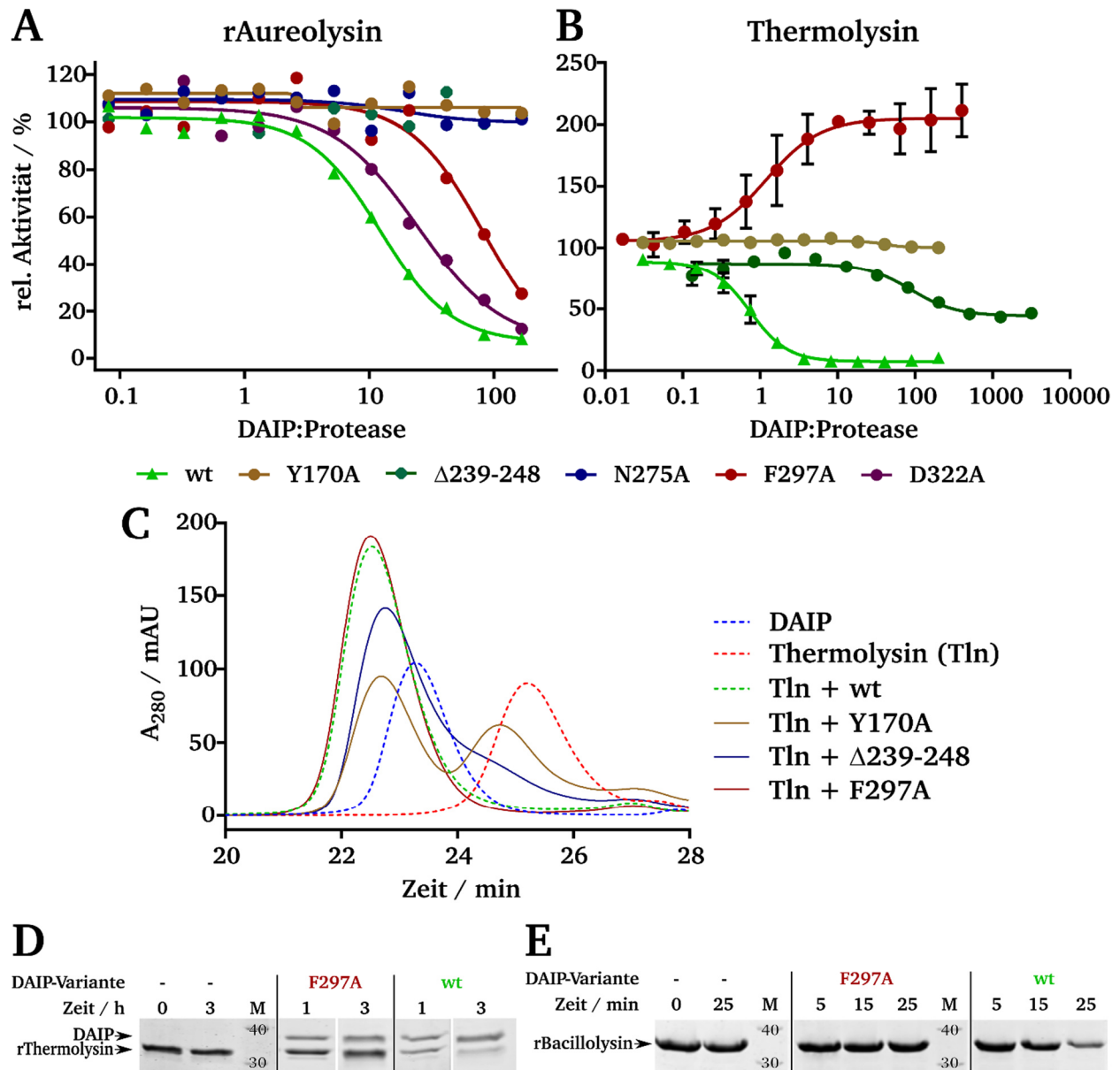
---

Durch seine hervorstechende Konformation präsentierte sich weiterhin der DAIP-Loop zwischen Glu239 und Gly248 in der Modellstruktur als potentielle Plattform zur raschen Orientierung und Fixierung der Protease über ihr C-terminales Fragment (Abb. 4.52, E). Die *Clashes* im Bereich des starren Loops der Sm-TG-Bindestelle Gln298, genauer Phe297, sowie der unbesetzten Calciumbindestelle Asp322 von DAIP innerhalb der Komplexstruktur gaben Anlass zu der Vermutung, dass dieser Bereich einen starken Einfluss auf die postulierten Konformationsänderungen haben könnte (Abb. 4.52, F).

Besonders die anzunehmende Verdrängung der Thermolysin-Helix über Leu144 und Ala147, welche auch die essentiellen Aminosäuren des Thermolysin-Aktivzentrums trägt, sprach für diese Aminosäuren. Die entsprechenden DAIP-Positionen sollten daher im Folgenden einzeln gegen Alanin ausgetauscht oder im Falle des Loops Asp239-Gly248, vollständig entfernt werden. Der Sequenzvergleich der untersuchten Proteasen zeigte dabei die erwartungsgemäß hohe Homologie bei den potentiell mit DAIP interagierenden Aminosäuren (Abb. 4.53, gelbe und lila Balken). Weiterhin spiegelte sich die räumliche Distanz der interagierenden Seitenketten zu den stabilisierenden Calcium-Ionen auch in der Primärsequenz wider. Anhand der früher identifizierten Autolyseschnittstellen ließ sich erkennen, dass lediglich die Positionen Asn112↓Ala113 und Glu119↓Met120 der M4-Proteasen durch die Bindung von DAIP direkt beeinflusst werden. Eine transiente Wirkung auf die weiteren Hydrolysestellen nach DAIP-Interaktion war jedoch nicht auszuschließen. Die abgeleiteten Alanin- und Deletions-Varianten von DAIP wurden vergleichend mit dem Wildtyp hinsichtlich Inhibition, Autolyse-Induktion, Komplexbildung (Abb. 4.54) sowie genereller Bindung analysiert (Tab. 4.8). Dabei offenbarten sich teilweise signifikante Abweichungen zum Wildtyp in der individuellen Wirkung gegenüber den verschiedenen Metalloproteasen, weswegen im Folgenden hauptsächlich auf die Unterschiede und deren Bedeutung eingegangen werden soll.

Während bei Inkubation fast aller DAIP-Varianten mit Pseudolysin und Bacillolysin über die Komplexbildung (nicht-funktionelle Protease) hinaus auch ein ähnliches Inhibitionsverhalten (aktive Protease) zu erkennen war (Abb. 7.11 und Abb. 7.12), ließen sich jedoch deutliche Wirkungsunterschiede gegenüber den anderen Zielproteasen erkennen (Abb. 4.54 und Tab. 4.7). rAureolysin wurde bspw. durch die Varianten DAIP-F297A (dunkelrot) und -D322A (dunkellila) deutlich schlechter inhibiert und behielt nach Vereinigung mit DAIP-Y170A, -Δ239-248 und -N275A sogar seine komplette Aktivität (Abb. 4.54, A). Auf Thermolysin wiederum zeigten deutlich weniger Varianten einen signifikanten Einfluss. Während die Variante Y170A analog zu rAureolysin keine Inhibition mehr erkennen ließ, offenbarten vor allem F297A und die Deletionsmutante Δ239-248 besonders starke, gegenläufige Effekte auf die Aktivität der Protease (Abb. 4.54, B). Erstere induzierte entgegen der Erwartung in einem stöchiometrischen Verhältnis eine Verdopplung der *DabSFans*-Hydrolyse-Rate, wohingegen die Deletionsvariante sich durch eine deutlich schlechtere, maximal 50%ige Inhibition auszeichnete. Beides waren Hinweise auf eine konformationelle Beeinflussung von Thermolysin. Zudem

zeigten GPC- sowie ITC-Untersuchungen, dass im Falle von F297A weiterhin mit hoher Affinität ein stabiler Komplex ausgebildet wird (Abb. 4.54, C, dunkelrot und Tab. 4.8).



**Abb. 4.54 DAIP-vermittelte Komplexbildung, Inhibition und Autolyse treten nicht zwangsweise gemeinsam auf.** A/B, Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Protease-Inhibition. 4.5 nM rAureolysin bzw. 5 nM Thermolysin wurden jeweils mit den angegebenen Mengen der DAIP-Varianten versetzt und umgehend die Aktivität über *DabSFans*-Hydrolyse bestimmt. Die Detektion der Dipeptid-Hydrolyse erfolgte in 50 mM Tris und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7.5 bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  340 nm) und 30 °C. C, 15  $\mu\text{M}$  Thermolysin und 15  $\mu\text{M}$  einer DAIP-Variante wurden vereinigt und über Superdex 200 (3.2/300 *increase*, 2.4 ml) bei 75  $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  in 50 mM Tris, 300 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  getrennt. D, fehlende Autolyse von Thermolysin nach Komplexbildung. 8  $\mu\text{M}$  rThermolysin wurden mit DAIP-F297A bzw. dem Wildtyp äquimolar gemischt und für bis zu 3 h bei 37 °C in 50 mM Tris und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7.5 inkubiert. E, fehlende Autolyse von Bacillolysin trotz Inhibition und Komplexbildung. rBacillolysin (15  $\mu\text{M}$ ) wurde mit 0.5  $\mu\text{M}$  wt DAIP bzw. F297A für bis zu 25 min bei 37 °C in 50 mM Tris und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7.5 inkubiert und zu den angegebenen Zeiten Proben durch Denaturierung bei 95 °C entnommen. Die Visualisierung erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung.

Die Elutionsprofile von Y170A (braun) und  $\Delta$ 239-248 (dunkelblau) ließen den Schluss zu, dass, falls überhaupt ein Komplex gebildet wurde, dieser nicht mehr die Stabilität des Wildtyps besaß und damit während der Chromatographie wieder zerfiel.

**Tab. 4.8 Übersicht der thermodynamischen Bindungseigenschaften, Inhibition und Autolyse-Induktion der aus dem Komplex abgeleiteten DAIP-Varianten.**

Protease	DAIP	Autolyse-Induktion	Inhibition	$\Delta G$ / kJ*Mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ*Mol <sup>-1</sup>	-TAS / kJ*K <sup>-1</sup> *Mol <sup>-1</sup>	Affinität (K <sub>d</sub> ) / nM
<b>Pro-rBacillolysin-E138A</b>	<i>wt</i>	nein	n.b.		Keine Bindung!		-
<b>rBacillolysin-E138A</b>	<i>wt</i>	<i>ja</i>	n.b.	-69.7	70.1	-139.8	24.8±6.0
<b>rBacillolysin</b>	<i>wt</i>	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-51.0	52.5	-103.6	28.4±5.4
	E99A	beschleunigt	<i>ja</i>	-50.9	169.0	-220.0	<5
	N101A	beschleunigt	<i>ja</i>	-43.4	103.0	-146.0	10.1±1.8
	D122A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-43.9	91.9	-136.0	8.0±2.5
	Y170A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-40.8	99.8	-141.0	31.2±4.3
	Δ239-248	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-48.2	42.4	-90.6	<5
	N275A	beschleunigt	<i>ja</i>	-44.2	119.0	-163.0	7.1±1.8
	F297A	nein	<i>ja</i>	-43.2	65.8	-109.0	10.8±4.2
	D322A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-49.3	89.7	-139.0	23.7±3.6
<b>Thermolysin</b>	<i>wt</i>	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-42.5	-16.8	-25.7	48.0±9.7
	E99A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-44.0	23.7	-67.7	27.0±6.5
	N101A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-46.5	-18.5	-28.0	10.0±3.8
	D122A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-43.7	12.9	-56.6	28.6±7.2
	Y170A	beschleunigt	nein		Keine Bindung!		-
	Δ239-248	verlangsamt	50%		Keine Bindung!		-
	N275A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-47.0	40.5	-87.5	8.1±5.4
	F297A	nein	nein	-47.1	-66.8	19.8	8.7±2.6
	D322A	<i>ja</i>	<i>ja</i>	-46.1	54.2	-100	11.5±4.6
<b>(r)Pseudolysin(-E141A)</b>	<i>wt</i>	nein ( <i>ja</i> )	<i>ja</i>	-48.1	35.0	-83.1	6.6±2.0
<b>rAureolysin</b>	<i>wt</i>	<i>ja</i>	<i>ja</i>		nicht bestimmt		-

Eines der erstaunlichsten Ergebnisse war, dass DAIP-F297A gegenüber Thermolysin und rBacillolysin noch vollständig bindungsaktiv (Tab. 4.8) und, zumindest gegenüber Letzterem, voll inhibitorisch war (Tab. 4.7), jedoch in beiden Fällen keine Autolyse mehr induzieren konnte (Abb. 4.54, D und E). Interessanterweise veränderten sich die thermodynamischen Eigenschaften der Interaktion mit rBacillolysin im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügig, was für einen sehr ähnlichen Bindungsmodus sprach (Tab. 4.8, rot). Im Falle von Thermolysin hingegen führte der Aminosäureaustausch an DAIP zu einem deutlichen Enthalpiegewinn, was zunächst auf eine stärkere Bindung der beiden Proteine schließen ließ. Dieser Energiegewinn erfolgte jedoch auf Kosten der Entropie und damit der Flexibilität, was möglicherweise auch die gesteigerte *DabSFans*-Hydrolyse mit einer Fixierung der Bindetasche erklärt. Auffällig war der bei Bindung der DAIP-Varianten an rBacillolysin im Vergleich mit Thermolysin auftretende durchwegs hohe Entropiegewinn, was jedoch im Einklang mit den oben beschriebenen durch die Interaktion ausgelösten konformationellen Änderungen bzw. einer schnellen Autolyse stand. Eine beschleunigte Autolyse von rBacillolysin durch die DAIP-Varianten E99A, N101A und N275A stützten mit ihrer nochmals gesteigerten Entropie diese Annahme (Tab. 4.8, grün). Das Ausbleiben einer Bindung der Varianten Y170A und Δ239-248 an Thermolysin ließ sich durch die weiterhin auftretende Autolyse nicht bestätigen und war höchstwahrscheinlich auf die bei der ITC verwendeten Proteinkonzentrationen zurückzuführen, die eine zu geringe Bindungswärme erzeugten.

Interessanterweise blieb bei allen bindenden DAIP-Varianten, trotz der beobachteten Differenzen, eine hohe Affinität zu den Metalloproteasen erhalten, welche über ITC nicht hinreichend bestimmt werden

---

konnte. Es zeigte sich jedoch aufbauend auf den vorherigen Ergebnissen, dass Bindung, Inhibition und die Befähigung zur Autolyseinduktion des Zielenzyms nicht zwangsweise miteinander einhergehen.

---

## 5. Diskussion

### 5.1. Strukturelle und biochemische Charakterisierung der Glutaminbindestellen von DAIP

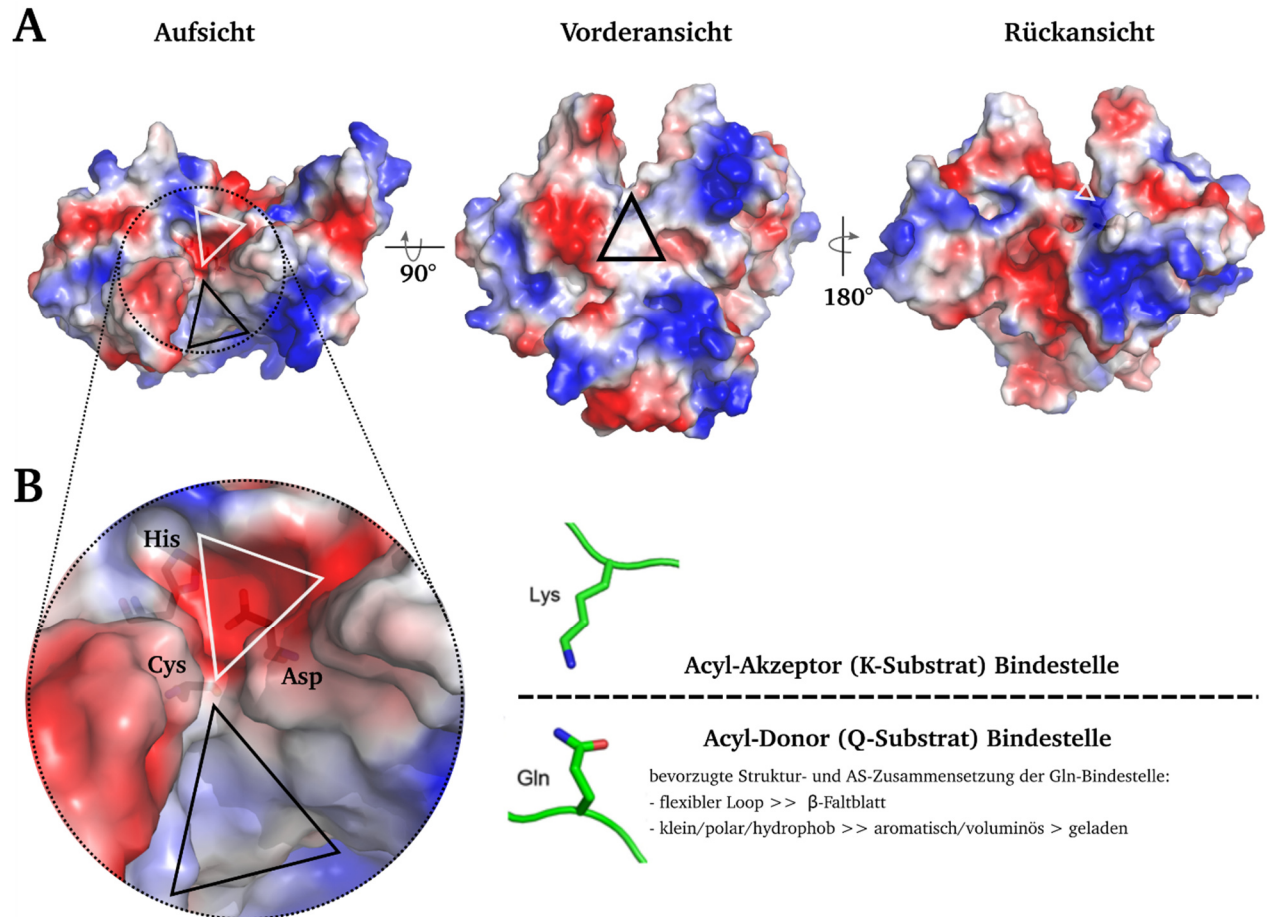
Die Aufklärung der Spezifität und Selektivität von *Sm*-TG trat in den letzten Jahren zunehmend in den Vordergrund, da die zielgerichtete enzymatische, wenn möglich orthogonale, Konjugation von Proteinen mit kleinen Molekülen größere Bedeutung gewonnen hatte. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit mit dem physiologischen Substrat DAIP war, das Verständnis für die Katalyse des Enzyms und damit den wissenschaftlichen Kenntnisstand zu vertiefen.

Bei der Analyse der Glutaminsequenzen anhand der Primärstruktur des DAIP konnten zunächst weder Konsensus-Sequenzen für die Q-Substratbindestelle noch die K-Substratbindestelle identifiziert werden (vgl. Tab. 4.3). Weiterhin befanden sich in den Sequenzen, die die vorhandenen Glutaminreste Gln39, Gln65, Gln144, Gln298 und Gln345 flankieren, keine der über *mRNA*- oder *Phage-Display* vorhergesagten Aminosäuren in den entsprechenden Positionen. <sup>[122, 123]</sup> Die DAIP-Bindemotive enthalten weder aromatische Aminosäuren noch Arginine in Position -3, kein Prolin oder Arginin in Position +1 und auch keine Glutaminpaare. DAIP unterscheidet sich demnach, trotz effizienter Modifikation durch *Sm*-TG, bereits bei der isolierten Betrachtung der Glutaminsequenzen von den Substratbindemotiven der untersuchten Glutaminpeptide (vgl. Tab. 2.1). <sup>[122, 123, 127]</sup> Es erscheint daher naheliegend, dass die Interaktion zwischen *Sm*-TG und dem physiologischen Substrat DAIP nicht nur durch die direkte molekulare Umgebung beeinflusst wird, sondern von weiteren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht identifizierten Faktoren abhängig ist, die eine effiziente Modifikation der Glutaminbindestellen durch *Sm*-TG begünstigen.

Wie zuvor bereits durch Kashiwagi *et al.* gezeigt werden konnte, sind die Aminosäuren des Aktivzentrums von *Sm*-TG am Boden einer 16-Å-tiefen Rinne angeordnet, welche von zwei Seiten des scheibenförmigen Enzyms zugänglich ist. <sup>[74]</sup> Der Vorhof auf der einen Seite des flachen Enzyms, die durch die unmittelbare Nähe des katalytischen Cys64 als Glutaminbindeseite bezeichnet wird, weist eine hauptsächlich hydrophobe Oberfläche auf, welche nur von wenigen positiv geladenen Bereichen unterbrochen wird. Der Vorhof auf der Rückseite des Enzyms hingegen ist stark negativ geladen (Abb. 2.3; Abb. 5.1). Die Ladungsverteilung am Fronteingang und die Orientierung des Cystein-Thiolatrests schaffen die Voraussetzung zur Bindung des Acyl-Donors (Q-Substrat), wohingegen die negativen Ladungen und die Anwesenheit des katalytischen Histidins bzw. Aspartats auf der gegenüberliegenden Seite die Anlagerung des positiv geladenen Acyl-Akzeptors (K-Substrat) begünstigen soll. Durch Assemblierung des Enzyms mit den zu verknüpfenden Substraten bildet sich nach diesem Modell ein ternärer Komplex. <sup>[74]</sup>

Mit dieser Arbeit konnte aufbauend auf vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt werden, dass Substratglutamine in  $\beta$ -Faltblättern aufgrund der eingeschränkten Flexibilität und Zugänglichkeit deutlich schlechter modifiziert werden als in *Loops* präsentierte Bindestellen. Diese passen sich durch

ihre höheren Freiheitsgrade leichter der Bindungsrinne von *Sm*-TG an, um das katalytische Cys64 zu erreichen. In Übereinstimmung mit den molekularen Eigenschaften der Bindungsrinne konnte auch die effiziente Markierung der Bindestelle Gln39 mit ihren hauptsächlich kleinen polaren und hydrophoben Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung erklärt werden.



**Abb. 5.1 Die Bindung von *Sm*-TG an ein Glutamin wird maßgeblich über die Flexibilität und AS-Zusammensetzung des Substrats bestimmt (publiziert in Fiebig *et al.*, 2016).<sup>[222]</sup>** A, elektrostatische Oberflächenpräsentation der *Sm*-TG von *S. mobaraensis* (PDB ID: 1IU4). Der vordere Vorhof (schwarzes Dreieck) besitzt einen Streifen positiv geladener Aminosäuren, welcher wahrscheinlich den Acyl-Donor (Q-Substrat) bindet. Der rückseitige Vorhof (weißes Dreieck) ist stark negativ geladen und zeigt damit die Voraussetzungen den positiv geladenen Acyl-Akzeptor (Ammoniumkation des K-Substrats) ionisch zu binden. B, AS der katalytischen Triade (Cys64, Asp255, His274) in der Nahaufnahme. Die Bindungsrinne verengt sich in Richtung von Cys64, was eine hohe Flexibilität der Glutaminbindestelle zur effizienten Anlagerung voraussetzt. Neben der Flexibilität werden vor allem kleine, unpolare, hydrophobe, ungeladene AS-Reste in der näheren Umgebung bevorzugt, wohingegen voluminöse/aromatische bzw. geladene Seitenketten potentiell die Ausrichtung des Glutamins in der Bindungsrinne stören und daraus ein ineffizienter Umsatz resultiert.

Die ausladenden Seitenketten der Gln298-Bindestelle hingegen vermindern aufgrund sterischer Faktoren generell die Reaktivität. Ohne die konformationelle Fixierung in einer  $\beta$ -hairpin wäre auch bei Q298 eine noch stärker reduzierte Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten gewesen, wie Siegmund *et al.* anhand des von Gln298 abgeleiteten disulfidverbrückten GEN-Tags im Vergleich zu dessen reduzierter Variante herausarbeiten konnten.<sup>[223]</sup> Interessanterweise zeigte das Bindemotiv als terminaler Tag eine vielfach höhere Modifikationsrate durch *Sm*-TG als die native Sequenz innerhalb der DAIP-Variante Q298 (vgl. Abb. 4.17, A und B). Die eingeschränkte Flexibilität der starren  $\beta$ -hairpin (Gln298), welche mittels Cystinbrücke im GEN-Tag nachgeahmt wurde, verliert demnach durch die



---

terminale Positionierung, und damit nur einseitigen Fixierung, ihre Relevanz. Damit konnte aufgezeigt werden, dass das gleiche Bindemotiv abhängig von seinen Freiheitsgraden eine stark abweichende Umsetzung durch *Sm*-TG erfährt. Der beste Umsatz ist daher für Bindemotive in Form eines Peptids (keine Einschränkung) zu erwarten, gefolgt von terminalen *Tags* (einseitige Fixierung). Die Einflüsse der lokalen Flexibilität, der flankierenden Aminosäuren sowie der generellen Zugänglichkeit durch das Enzym kommen hingegen bei Bindestellen innerhalb eines Proteins (doppelte Fixierung) viel stärker zum Tragen. Anhand der kinetischen Daten konnte in dieser Arbeit für Q39 eine etwa 3-fach höhere Vernetzungsaktivität im Vergleich zu Q298 ermittelt werden, was die Vermutung nahelegt, dass mit diesem Bindemotiv und der terminalen Position eine noch effizientere Konjugation im Vergleich zum *GEN-Tag* möglich ist. Obwohl Gln345 durch seine endständige Position 3 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt zwar die Grundvoraussetzung der Flexibilität besitzt, vermindern vornehmlich die vorausgehenden Glutamate (Ladung) sowie die darauffolgenden Histidine (Ladung/sterische Behinderung) einen effizienten Umsatz. Unter dem Aspekt der bei Cetuximab-*GEN* beobachteten Resultate hat dies wahrscheinlich regulative Ursachen, um eine *Sm*-TG-vermittelte Polymerisation unter physiologischen Bedingungen zu unterbinden.

Die beiden in  $\beta$ -Faltblättern anzutreffenden Glutamine Gln65 und Gln144 wurden unter den verwendeten Bedingungen zwar ebenfalls von *Sm*-TG modifiziert, jedoch lag der Biotinylierungsgrad sehr niedrig. Sie dürften daher auch unter physiologischen Bedingungen für die Vernetzung von DAIP ohne Bedeutung sein. Der Einfluss flankierender Aminosäuren konnte des Weiteren durch gezielte „Inaktivierung“ der Gln39-Bindestelle mittels Austauschs kleiner/unpolarer gegen große/geladene Aminosäureseitenketten hinreichend gezeigt werden (vgl. Abb. 4.17). Es wurde herausgearbeitet, dass voluminöse Aminosäuren, die die Bindestelle am terminalen Ende eines beliebigen Proteins kaum beeinträchtigen (*GEN-Tag*), auch ein Glutamin (Q39) in einer ausgedehnten, flexiblen *Loop*/Schleife inaktivieren. Eine negative Ladung erwies sich hingegen als klares Ausschlusskriterium für interne und terminale Bindestellen von DAIP. Dass es auch Ausnahmen von dieser Regel gibt, konnte jedoch durch Jeger *et al.*, 2010, über die Markierung eines deglycosylierten IgG-Antikörpers an Gln295, gezeigt werden. <sup>[127]</sup> Zur näheren Charakterisierung müsste daher ein direkter Vergleich mit bspw. DAIP-Q39 durchgeführt werden.

Mit dieser Arbeit in Einklang stehende Ergebnisse konnten auch im Zuge der Charakterisierung des physiologischen *Sm*-TG-Substrats SPI<sub>P</sub> aus *S. mobaraensis* durch Jüttner *et al.*, 2018, gezeigt werden. <sup>[232]</sup> Von drei vorhandenen Glutaminen war lediglich das endständige Gln6 eine im Vergleich mit DAIP-Q39 schwache Bindestelle von mikrobieller Transglutaminase. Die geringe Reaktivität war jedoch, wie gezeigt werden konnte, vom benachbarten geladenen Lys7 bestimmt. Im Gegensatz zu den Glutaminen des DAIP, welche vornehmlich in exponierten Regionen anzutreffen sind und daher strukturell übergeordneten Effekten weniger unterliegen, eignete sich die kompakte Struktur des SPI als mächtiges

---

Werkzeug zur Aufklärung der initialen Assemblierung von *Sm*-TG und seinem proteinösen Glutaminsubstrat. Die Aufklärung der Tertiärstruktur ermöglichte es hier, distinkte ladungsspezifische Mutationen außerhalb des eigentlichen Bindemotivs einzuführen, wodurch in den meisten Fällen eine gesteigerte Biotinylierung erreicht werden konnte. Die Interaktion von *Sm*-TG und der Bindestelle war zwar vornehmlich von den in dieser Arbeit bestimmten Faktoren abhängig, jedoch zeigten die generierten Ergebnisse und der Vergleich mit anderen physiologischen Substraten, dass die übergeordnete strukturelle Umgebung einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die initiale Assemblierung des Enzym-Substrat-Komplexes hat. Dies ist auch wahrscheinlich einer der Gründe, weswegen mTG-Tags meist terminal eingesetzt werden. Die Integration eines identifizierten Bindemotivs innerhalb eines Proteins ist generell möglich, aber die geeignete Position kann gegenwärtig, trotz Fortschritten in der Bioinformatik, nur empirisch bestimmt werden.<sup>[126]</sup> So konnten Rachel *et al.*, 2017, durch Einbringung einzelner Glutamine in *GB1*, einem Modellprotein zur Untersuchung von Proteinfaltung und -Entfaltung, den Einfluss der Bindestellen-enthaltenden Sekundärstruktur näher beleuchten.<sup>[233]</sup> Die Eignung von *GB1* zur Aufklärung der Enzym-Substrat-Interaktion ist jedoch aufgrund seiner Größe (6.2 kDa) und der per Definition hohen intrinsischen Flexibilität fraglich. Zudem basieren diese Untersuchungen in den meisten Fällen auf der enzymatischen Konjugation kleiner Moleküle an artifiziell eingebrachte Bindestellen und spiegeln so nur unzureichend die Vernetzung zweier Proteine wider. Die präsentierten Ergebnisse schließen zudem einen Einfluss unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente auf die Katalyseeffizienz komplett aus und widersprechen damit den hier präsentieren und aus vorangegangenen Untersuchungen hervorgegangenen Erkenntnissen. Des Weiteren sind die Ergebnisse von Rachel *et al.*, 2017, insoweit auch mit Vorsicht zu betrachten, da die Fluoreszenz-Quantifizierung direkt im Gel erfolgte, wodurch emissionsbeeinflussende Effekte durch SDS in Kombination mit der Proteinumgebung nicht ausgeschlossen werden können.

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Jüttner *et al.*, 2018, zeigen *Sm*-TG in Komplex mit einem von SPI<sub>p</sub> abgeleiteten Inhibitorpeptid und damit die erste jemals aufgeklärte Struktur des Vernetzungsenzyms mit einem kovalent gebundenen Pseudosubstrat.<sup>[234]</sup> Die Lage des Peptids in der Bindungsrinne unterstreicht die Annahme der zum vorderen Vorhof ausgerichteten Orientierung des Glutamin-Bindemotivs. Die Ausrichtung spricht aber vor allem für eine der Vernetzung vorangehende Selbstassemblierung von Substratproteinen, welche anschließend von *Sm*-TG wie bei einem Reißverschluss hintereinander verbunden werden. Ein von DAIP-Q39 abgeleitetes und ebenfalls untersuchtes Peptid hingegen besaß zwar hohe inhibitorische Potenz, konnte jedoch, vornehmlich aufgrund seiner hohen Flexibilität, kristallographisch nicht hinreichend aufgelöst werden, wohingegen das SPI-abgeleitete Peptid über das benachbarte Lysin mittels Salzbrücke fixiert wurde. Es zeigte sich dadurch zudem, dass symmetrieähnliche peptidische Glutaminsubstrate wie Q39 meist keine bevorzugte Orientierung von N- zu C-Terminus bzw. umgekehrt bei der Bindung an *Sm*-TG aufweisen. Innerhalb

---

eines Proteins jedoch geben jedoch meist übergeordnete strukturelle Faktoren in unmittelbarer Nähe zum reaktiven Glutamin eine Vorzugsrichtung vor, wie am Beispiel von Q39-lo1 und Q39-lo2 gezeigt werden konnte.

In dieser Arbeit konnte durch Produktion von DAIP und dessen Mangel-Varianten die Aufklärung der ersten natürlichen Glutaminbindestellen der *Sm*-TG von *S. mobaraensis* bestimmt und charakterisiert werden. <sup>[222]</sup> Homologien zu aus Peptid-Bibliotheken hervorgegangenen Sequenzen konnte dabei jedoch nicht angetroffen werden. Folglich reflektieren kleine Peptide und darauf basierende *Sm*-TG-*Tags* nur ungenügend die Eigenschaften eines natürlichen *Sm*-TG-Substratproteins wie DAIP, bei dem, über die bindemotivabhängigen Voraussetzungen hinausgehend, weitere Faktoren die initiale Assemblierung dirigieren. Interessanterweise zeigte die *seven-bladed  $\beta$ -propeller*-Struktur des DAIP eine räumliche Häufung von vier der insgesamt fünf Glutamine auf einer Seite des Propellers, was die Vermutung nahelegt, dass die physiologische Vernetzung des inaktivierenden Proteins orts- und orientierungsspezifisch verläuft. Es konnte gezeigt werden, dass Solvenzzugänglichkeit und Positionierung außerhalb von  $\beta$ -Faltblättern die Grundvoraussetzungen für eine effiziente Modifikation darstellen. Auf Grundlage der strukturellen Daten und bestimmten Umsatzraten wurden die präferierten Eigenschaften der Glutamin-flankierenden Aminosäuren in der folgenden Reihenfolge absteigend eingeordnet: klein/polar/hydrophob >> aromatisch/voluminös > geladen. Da es sich jedoch bei DAIP um ein reines  $\beta$ -Faltblatt-Protein handelt, müssen, zur Validierung und Erweiterung des aufgestellten Modells, weitere physiologische Substratproteine der *Sm*-TG, welche auch  $\alpha$ -helikale Bereiche tragen, strukturell und biochemisch analysiert werden.

## 5.2. M4-Metalloproteasen und der Mechanismus des DAIP

Die hervorragenden Substrateigenschaften des DAIP von *S. mobaraensis* für das Vernetzungsenzym *Sm*-TG legten bereits früh die Vermutung nahe, dass das Autolyse-induzierende Protein unter physiologischen Bedingungen mit anderen Proteinen kovalent verbunden und damit lokal fixiert wird. Durch die Beteiligung von Transglutaminasen beim Lufthyphen- und Sporenaufbau ihrer mikrobiellen Produzenten konnte davon ausgegangen werden, dass DAIP, wie auch die anderen Inhibitorproteine, in Übereinstimmung mit der Funktion des intrazellulären Enzyms von *B. subtilis*, in die Zellwände und Sporenhüllen integriert wird (s. 2.2.3). <sup>[140, 142, 143]</sup> Zusammen bilden sie so höchstwahrscheinlich einen wirkungsvollen Schutz nach außen vor Rodlin- und Chaplin-Abbau durch exogene Proteasen koexistierender Mikroorganismen innerhalb des Habitats. <sup>[235, 236]</sup> Zu diesen zählen vor allem neutrale Metalloproteasen aus der Thermolysin-Familie (M4). Im Vergleich mit den meisten proteinösen und peptidischen Inhibitoren wie SMPI bzw. Phosphoramidon kann DAIP jedoch auch eine vollständige Autolyse des Zielenzyms induzieren. <sup>[61, 188]</sup> Die bereits 2009 gemachten Beobachtungen mit dem „empfindlichsten“ Vertreter, *Dispase* (Bacillolysin, Gentlyase), warfen die Fragen auf, wie DAIP die schnelle Eigenhydrolyse der Protease vermittelt und ob dieser Effekt auch bei weiteren Mitgliedern der

---

M4-Familie zu beobachten ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Produktions-, Reinigungs- und Prozessierungsverfahren zur rekombinanten Herstellung diverser aktiver sowie nicht-funktioneller Metalloproteasen entwickelt. Die überwiegende Verwendung codon-optimierter DNA-Sequenzen - das Gen für Bacillolysin (npr) blieb unverändert - in Kombination mit dem starken T7-Promotor erwies sich hierbei jedoch als Nachteil. Die hohe Expressionsrate von rThermolysin führte, trotz Sekretion des Enzyms in das Periplasma, rasch zur Abnahme der Zelldichte nach der Induktion oder, wie im Fall von rAureolysin, zur intrazellulären Aggregation in Form von *inclusion bodies*. Die bei der Optimierung ausgetauschten seltenen Codons, welche möglicherweise über die Erhöhung der Translationsgeschwindigkeit auch die Faltung und Metalladsorption beeinflussten, hatten auch die Eigenschaften von rekombinantem Thermolysin so verändert, dass eine geringere Stabilität im Vergleich mit dem käuflichen Enzym zu beobachten war. <sup>[237]</sup>

Neutrale Metalloproteasen wie Bacillolysin benötigen für die korrekte Faltung fast ebenso große Propeptide, welche nach Einnahme der funktionellen Tertiärstruktur autokatalytisch abgebaut werden. <sup>[176]</sup> Die Produktion der nicht-funktionellen Protease-Zymogene, bei denen das katalytische Glutamat gegen Alanin ausgetauscht wurde, erfolgte daher durch Translation zweier unabhängiger Polypeptidketten. <sup>[174, 180]</sup> Dies hatte allerdings auch zur Folge, dass beide Zymogenhälften aufgrund ihrer starken Interaktion nicht mehr zu trennen waren. Da das Propeptid nur durch proteolytischen Abbau entfernt werden konnte, wurde auch die Expression in einer Polypeptidkette analog zu den aktiven Varianten untersucht. Die essentielle Funktion des Propeptids und dessen C-Terminus bei der Aktivierung verhinderte jedoch die artifizielle Einbringung spezifischer Proteaseschnittstellen wie die der TEV-Protease. <sup>[176, 238]</sup> Modifikationen im Bereich der nativen Aktivierungsschnittstelle resultierten in nicht-aktivierbaren oder sogar fehlgefalteten Proenzymen. Auch eine Behandlung des gebildeten Zymogens mit Trypsin ergab aus Mangel entsprechender Schnittstellen ein N-terminal verlängertes reifes Enzym mit veränderten biochemischen Eigenschaften. Aufgrund des strikt geregelten und komplexen Faltungsablaufs, den M4-Proteasen durchlaufen, war auch die Verwendung alternativer N-terminaler Affinitäts/Fusions-Tags wie GST (Glutathion-S-Transferase) und SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifier*) nicht möglich. <sup>[239, 240]</sup>

Wie die Untersuchungen zur Propeptid-Prozessierung zeigten, ist die Fähigkeit zur interspezifischen Aktivierung nicht nur innerhalb der M4-Familie hochkonserviert. Eine Vielzahl weiterer Proteasen bewerkstelligen in ähnlicher Weise den proteolytischen Abbau des M4-Propeptids (vgl. Abb. 4.40). Diese Tatsache legte die Vermutung nahe, dass sich die Anwesenheit exogener Proteasen durch eine beschleunigte Aktivierung zunutze gemacht wird. <sup>[241]</sup> Im Gegensatz zu den meisten Vertretern der Thermolysin-Familie besitzt das Propeptid von Aureolysin wie Nickerson *et al.*, 2008, zeigen konnten, neben der intrinsischen Chaperon-Funktion jedoch keine inhibitorische und damit stabilisierende Wirkung auf das reife Enzym. <sup>[224]</sup> Obwohl die Aktivierung bei Aureolysin wie bei anderen Metalloproteasen der M4-Familie durch zwei initiale Hydrolyseschritte innerhalb der FTP-Domäne

---

erfolgt, scheint die Interaktion beider Propeptid-Domänen (FTP & PepSY) mit dem maturen Enzym im Vergleich zu den anderen Vertretern gestört zu sein (vgl. Abb. 2.6 und Abb. 4.39). Dies war, neben der Überexpression durch Verwendung eines codon-optimierten Gens, wohl ein zweiter Faktor, weshalb aktives und vor allem nicht-funktionelles rAureolysin unter den verwendeten Bedingungen nur in geringen Ausbeuten bzw. gar nicht isoliert werden konnten.

Zum Verständnis des Katalysemechanismus von DAIP war die Bestimmung der Tertiärstruktur einer der essentiellen Schritte, da sie aufgrund des Fehlens homologer Primärsequenzen erstmals ermöglichte, Rückschlüsse auf die Funktion, evolutionäre Herkunft und Verwandtschaft des Proteins zu ziehen. <sup>[222]</sup> DAIP gehört zu den  $\beta$ -Propeller-Proteinen, welche in der Regel aus vier bis zehn Propellerblättern (*Blades*) mit jeweils vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen. <sup>[242]</sup> Siebenblättrige  $\beta$ -Propeller wie DAIP stellen dabei die vielseitigste Gruppe hinsichtlich ihrer Funktion dar, welche von Protein- und Ligandbindung über Hydrolyse bis hin zur Signaltransduktion und Strukturgebung reichen. <sup>[243]</sup> Eine an den Propeller fusionierte katalytische Domäne wie bei Dipeptidyl Peptidasen, Prolyl-Oligopeptidasen, Aminoacyl-Peptidasen und Matrixmetalloproteasen (MMP) in Form der Hämopekin-Domäne, war in DAIP nicht vorhanden. <sup>[244-247]</sup> Weiterhin konnten auch keine für die katalytische Aktivität von bspw. fünf- und sechsblättrigen Lactonasen, Paraoxonasen und Glutaminyl-Cyclasen benötigten Co-Faktoren in Form von Calcium-Ionen im zentralen Loch des Propellers, ausgemacht werden. <sup>[248-250]</sup> Das Fehlen dieser strukturellen Eigenschaften bestätigte die bereits früh angestellten Beobachtungen, dass von DAIP keine hydrolytische Aktivität ausgeht. <sup>[62]</sup>

Vorherige Untersuchungen demonstrierten zwar bereits die Unabhängigkeit der DAIP-Aktivität von extern zugeführten Calcium- und Zinkionen, jedoch konnte ein intermolekularer Calcium-Transfer nach Bindung der Metalloprotease an den  $\beta$ -Propeller zu Beginn dieser Arbeit noch nicht ausgeschlossen werden. <sup>[62]</sup> Wie sich zeigte, tragen die in der DAIP-Struktur identifizierten Calcium-Ionen und deren Bindestellen außerhalb des zentralen Propellerlochs jedoch nicht zu dessen Aktivität bei (vgl. 0 und 4.2.11). Vielmehr bestätigte die fehlende Assoziation von DAIP und *Pro*-rBacilolysin-E138A, dass der Mechanismus nicht auf dem Entzug des stabilisierenden Ca(3) basiert, wie er bei der EDTA-induzierten Autolyse von Thermolysin durch Exposition nativer Autolyseschnittstellen (Gly196/Leu197 und Ser204/Met205) beschrieben ist (vgl. Abb. 4.53). <sup>[230]</sup> Ein Vergleich eines Modells von *Pro*-rBacilolysin mit *Pro*-Vibriolysin MCP-02 legte nahe, dass diese Bindestelle innerhalb der NTD auch im inaktiven Zymogen frei zugänglich bleibt und damit nicht die präferierte Bindestelle des DAIP darstellt (vgl. Abb. 4.39 und Abb. 7.5). <sup>[173]</sup> Anders wäre die Inhibition und Autolyse-Induktion von Aureolysin und Pseudolysin, welche beide keine Ca(3)-Bindestelle besitzen, auch nicht zu erklären gewesen (vgl. Abb. 4.46 und Abb. 4.53). Die in dieser Arbeit präsentierten Daten beweisen klar, dass die DAIP- und die EDTA-induzierte Autolyse nur in Bezug auf das Endergebnis ähnlich sind, wohingegen sie sich durch die effektiven Konzentrationen, die pH-Abhängigkeit, die Calcium-Unabhängigkeit und das Fragmentierungsmuster unterscheiden (vgl. Abb. 4.37, Abb. 4.48). <sup>[230, 251]</sup>

---

Mit Gly257, dem N-Terminus des co-kristallisierten Thermolysin-Fragments, konnte zudem, trotz hoher Konservierung der nativen Autolyseschnittstellen unter den M4-Proteasen, eine bisher noch nicht beschriebene autolyseanfällige Peptidbindung identifiziert werden. Dies ist umso bemerkenswerter, da nach dem bisherigen Kenntnisstand nur zwei definierte Schnittstellen der Thermolysin-Autolyse bekannt waren. <sup>[230]</sup>

Die Verhinderung der mit der DAIP-Interaktion einhergehenden Autolyse stellte eines der größten Probleme bei der Charakterisierung des Mechanismus dar. Aufgrund des nicht-kovalenter Inhibitoren innewohnenden Gleichgewichtscharakters, der nie eine vollständige Inhibition aller Moleküle ermöglicht, erwies sich die biochemische Inhibierung nicht als zielführend (vgl. Abb. 4.38). Eine durch die DAIP-Bindung vermittelte Konformationsänderung der Bindetasche des Enzyms und der damit reduzierten Affinität der Inhibitoren  $\text{Zn}^{2+}$  oder Phosphoramidon konnte zunächst jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus dem kristallisierten Komplex mit dem CTF von Thermolysin und den daraus abgeleiteten DAIP-Varianten F297A und  $\Delta 239-248$  unterstützten jedoch die Annahme eines unmittelbaren Einflusses von DAIP auf das Aktivzentrum der Protease. Die Charakterisierung von *Dispase* und rBacillolysin(-E138A) aus *P. polymyxa* DSM-36 zeigte, dass beide Enzyme trotz diverser Punktmutationen, welche mit der hohen genetischen Diversität und Mutationsrate von *Firmicutes* der Gattung *Bacilli* zu erklären ist (persönliche Kommunikation: Prof. Kabisch, TU Darmstadt), weitestgehend identische Eigenschaften besitzen. Dies ermöglichte die Analyse der DAIP-Interaktion mit nicht-funktionellen Bacillolysin-Varianten, ohne eine Beeinflussung durch die kontinuierliche Abnahme des Zielenzyms in Kauf nehmen zu müssen. Die DAIP-induzierte Hydrolyse der nicht-funktionellen Metalloprotease-Varianten durch exogene Proteasen wie die Serinprotease Trypsin gaben hingegen bereits frühzeitig Anlass zu der Annahme, dass die Aktivität des DAIP auf einer Exposition Autolyseanfälliger Peptidbindungen des Interaktionspartners basieren muss (vgl. Abb. 4.36).

Die breitangelegte Untersuchung des Substratspektrums von DAIP ermöglichte es, neben Bacillolysin weitere Thermolysin-ähnliche Zielproteasen zu identifizieren, wodurch sich das Autolyse-induzierende Protein als Plattform für die Interaktion mit Mitgliedern einer ganzen Enzym-Familie präsentierte. Die unterschiedliche Empfänglichkeit dieser Enzyme für die DAIP-induzierte Eigenhydrolyse erlaubte es erstmals äquimolare Komplexe mit aktiven und nicht-funktionellen Zielproteasen über ITC, TMAE oder GPC nachzuweisen und zu isolieren. Bemerkenswert waren die gegenüber den Erwartungswerten generell zu hohen Retentionszeiten der isolierten DAIP-Protease-Komplexe, welche zusammen mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie Hinweise auf eine strukturelle Veränderung der Proteine nach der Interaktion gaben (vgl. Abb. 4.42 und Abb. 4.44). <sup>[252]</sup>

Grundsätzlich inhibierte DAIP durch Bindung einer Protease vollständig deren proteolytische Aktivität. Nur bei Thermolysin verblieb eine Restaktivität von 10%, sowohl gegenüber dem Dipeptid *DabSFans* als auch Azocasein (vgl. Abb. 4.45). Des Weiteren zeigten die DAIP-Varianten  $\Delta 239-248$  nur noch eine



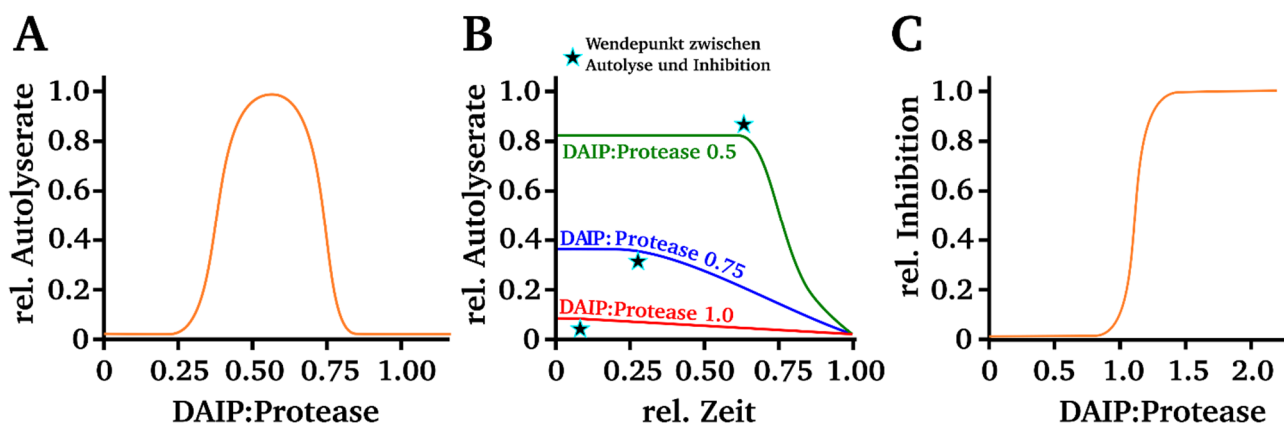
maximale Reduktion der Aktivität um 50% wohingegen DAIP-F297A sogar eine Aktivitätsverdopplung bewirkte (vgl. Tab. 4.7, und Abb. 4.54). Dies führte zu dem Schluss, dass DAIP nicht das Aktivzentrum blockiert, sondern die Umsatzrate (inhibierend/aktivierend) durch Konformationsänderung beeinflusst. Weiterhin ergaben die ITC-Untersuchungen, dass sich trotz hoher Affinität die Bindungsmodi der Zielproteasen beträchtlich unterschieden und damit auch Hinweise auf die Protease-spezifische Autolyse-Tendenz gaben (vgl. Abb. 4.43, Abb. 4.45 und Tab. 4.8). Auch wenn der DAIP-Mechanismus über ITC nicht hinreichend erklärt werden konnte, waren die hohe positive Enthalpie (Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Interaktionen, Störung der Hydrathülle) und die verhältnismäßig hohe Entropie (Flexibilitätsgewinn durch partielle Entfaltung) bei der Interaktion mit Bacillolysin klare Indizien für eine spezifische Proteasebindung und Modifikation der Zielenzymstruktur.<sup>[253, 254]</sup> Im Hinblick auf die ITC-Analyse der DAIP-Varianten und deren Bedeutung fällt eine zweifelsfreie Interpretation der Ergebnisse durch die über mehrere Interaktionspunkte zwischen DAIP und der Zielprotease vermittelte Enthalpie-Entropie-Kompensation generell schwer.<sup>[255]</sup> Der Einfluss des DAIP auf unterschiedliche Proteasen der M4-Familie legte aufgrund teils signifikanter Sequenzunterschiede vielmehr strukturelle Voraussetzungen/Eigenschaften des Zielenzym für die Spezifität des Propeller-Proteins nahe. Die M4-Metalloprotease TAMP aus *S. mobaraensis*, welche an der Prozessierung des Vernetzungsenzyms *Sm*-TG beteiligt ist, stellt im Vergleich mit den anderen untersuchten Proteasen die Ausnahme dar.<sup>[256]</sup> Die nachweislich fehlende Bindung, Inhibition sowie Autolyseinduktion der TAMP gaben Anlass zur näheren Untersuchung struktureller Differenzen gegenüber den identifizierten Zielproteinen. Auch wenn sich über ein *Phyre*<sup>2</sup>-Modell (nicht gezeigt) die hohe Homologie der katalytischen Domäne zu anderen Vertretern der M4-Familie offenbarte, besitzt TAMP jedoch zusätzlich an ihrem C-Terminus eine sog. P-Domäne. Diese stellen wichtige Merkmale der Subtilisin-ähnlichen Proprotein Convertasen (PC) dar und regulieren dabei die Enzymaktivität, Stabilität, Metall-Bindung und pH-abhängige Reaktionen.<sup>[257]</sup> Die Größe und Lokalisation am C-Terminus der katalytischen Domäne von TAMP und die über die Struktur des Komplexes aus DAIP und dem Thermolysin-Fragment abgeleitete Interaktionsfläche mit den Zielproteasen gaben Anlass zu der Annahme, dass die Bindung und damit die Wirkung vermutlich aufgrund sterischer Faktoren verhindert war. Die von Jüttner *et al.*, 2018, in *E. coli* produzierte aktive TAMP (57 kDa) konnte nach autokatalytischer Propeptidhydrolyse vollständig mit ihrer weiterhin fusionierten P-Domäne isoliert und untersucht werden.<sup>[256]</sup> Im Gegensatz dazu hatte das aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* isolierte Enzym lediglich eine Molmasse von 39 kDa, was für eine physiologische Prozessierung des Enzyms spricht.<sup>[82, 258]</sup> Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass nicht nur SSTI die Aktivität der TAMP moduliert, sondern, dass auch DAIP nach Abspaltung der P-Domäne durch Inhibition und Zersetzung an der Regulation der *Sm*-TG-aktivierenden Protease beteiligt sein könnte.

Bereits heute sind einige  $\beta$ -Propeller-Proteine bekannt, welche keine eigene bzw. über eine fusionierte Domäne vermittelte katalytische Aktivität besitzen, aber als Plattform für die Erkennung und Interaktion mit entsprechenden Zielproteinen dienen.<sup>[242]</sup> Zu diesen zählen unter anderem die WD40-Proteine, welche sich durch Tryptophan(W)/Aspartat(D)-Motive auszeichnen, die sich am Ende repetitiver Sequenzen aus etwa 40 Aminosäuren befinden und öfters in eukaryontischen Zellen höherer Lebewesen anzutreffen sind. Eine Rekrutierung weiterer Bindungspartner durch DAIP nach Assoziation mit der Protease ähnlich zu einigen Vertretern der WD40-Familie konnte hingegen ausgeschlossen werden.<sup>[259]</sup> Interessanterweise reguliert der verwandte *eight-bladed*  $\beta$ -Propeller WDR48 die Aktivität der spezifischen Protease USP46, welche an der Ubiquitin-Signal-Kaskade beteiligt ist, durch Stabilisierung und damit Erhöhung der *turnover rate*  $k_{cat}$ .<sup>[260]</sup> Ein in Grundzügen ähnliches Verhalten konnte bei den Untersuchungen der Interaktion von Thermolysin mit der DAIP-Variante F297A beobachtet werden. Diese zeichnete sich ebenfalls durch eine höhere Stabilität und gesteigerte Aktivität des Enzyms aus (vgl. Abb. 4.54, B und D). Ein DAIP-ähnliches Protein hingegen, welches sein Zielenzym bis hin zum vollständigen Aktivitätsverlust beeinflusst und zerstört, wurde bisher noch nicht beschrieben. Das  $\beta$ -Propeller-Protein DAIP ist in dieser Hinsicht bei der Ausnutzung struktureller Schwachstellen zur Zerstörung feindlicher Zielproteasen einmalig. Es konnte aufgezeigt werden, dass der beobachtete katalytische Charakter der Autolyse-Induktion durch DAIP zu einem großen Anteil auf die Affinität, Anfälligkeit und proteolytische Aktivität des Zielenzyms zurückzuführen war, wodurch sich auch die mit fortschreitender Inkubationsdauer unterschiedlich starke Abnahme der Protease erklären ließ (vgl. Abb. 4.38, C und Abb. 4.45, B). Durch die Fragmentierungsstudien war es möglich, zum einen die strukturelle Modifikation und damit verbundene Inhibition und zum anderen die nachfolgende Autolyse als zwei getrennt voneinander zu betrachtende Prozesse zu identifizieren, wovon Ersterer von DAIP und Letzterer von der Protease selbst abhing.

Die Trypsin-vermittelte Hydrolyse von fluoreszenzmarkiertem nicht-funktionellem rBacillolysin-E138A legte erstmals einen dreistufigen Mechanismus der DAIP-Katalyse, bestehend aus (I) Assoziation, (II) der geschwindigkeitsbestimmenden konformationellen Veränderung des Zielproteins und (III) der abschließenden Hydrolyse, nahe. Die Reaktionsraten korrelierten dabei mit den eingesetzten Konzentrationen an E138A und DAIP, wie der stetigen Abnahme der Fluoreszenzpolarisation entnommen werden konnte. Das mit COPASI entwickelte Modell implizierte auf Grundlage der ausgewerteten Daten, dass die Hälfte des Enzyms bereits nach 120 s in einen autolysebereiten Zustand überführt wurde und unterstreicht nochmals die Effizienz des DAIPs.<sup>[210]</sup> Eine langsame oder unzureichende strukturelle Beeinflussung war daher vermutlich auch einer der Gründe, weshalb Thermolysin, stabilisiert über ein weiteres  $\text{Ca}^{2+}$ , und Pseudolysin, stabilisiert über zwei Disulfidbrücken, der DAIP-Wirkung besser widerstanden als bspw. Bacillolysin und Aureolysin. Das DAIP:Protease-Verhältnis hat dabei bedeutenden Einfluss auf die beobachteten Effekte und gibt Anlass zu der Annahme, dass DAIP vornehmlich als „Proteasenfänger“ dient, welcher durch seine Interaktion als Nebeneffekt die

Hydrolyse des Zielproteins durch ungebundene Proteasen ermöglicht. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass sich das Autolyse-induzierende Protein unter physiologischen Bedingungen nicht in Lösung, sondern tendenziell durch *Sm*-TG quervernetzt in den Lufthyphen- und Sporenhüllen befindet, was das Gleichgewicht zwischen Inhibition und Autolyse ebenfalls beeinflussen könnte.

Neben den im DAIP-Thermolysin-Modell verdeckten Gln298, dessen  $\beta$ -turn höchstwahrscheinlich zur Konformationsänderung der Protease beiträgt, erscheint die Hauptglutaminbindestelle Gln39 weiterhin zugänglich und legt damit eine physiologische Fixierung des DAIPs unter Erhalt der Aktivität nahe. <sup>[222]</sup>



**Abb. 5.2** Schematische Übersicht des Einflusses der DAIP-Konzentration auf die Autolyseinduktion und Inhibition von M4-Metalloproteasen. A, die Geschwindigkeit der Autolyse wird maßgeblich durch das Verhältnis zwischen DAIP und der Zielprotease bestimmt und verläuft in einem definierten Bereich mit optimaler Geschwindigkeit. B, das Gleichgewicht zwischen Autolyse und Inhibition wird maßgeblich durch das DAIP:Protease-Verhältnis beeinflusst und verschiebt sich in dessen Abhängigkeit im Verlauf der Reaktionsdauer durch Abnahme freier Enzyme. C, im Gegensatz zur Autolyse verläuft die Inhibition stöchiometrisch.

Wie sich anhand der Ergebnisse annehmen ließ, spielen vermutlich auch amphiphile Moleküle, die von Streptomyceten sezerniert werden, eine Rolle bei der induzierten Autolyse. <sup>[228, 229]</sup> Strukturell verwandte Detergenzien begünstigten dabei im Zusammenspiel mit DAIP die konformationelle Veränderung widerstandsfähigerer Zielproteasen wie Thermolysin *in vitro* und erhöhten damit deren Autolyse-Geschwindigkeit (vgl. Abb. 4.48). Die Identifikation der zu Autolyse-Beginn geöffneten Peptidbindungen blieb wegen fehlender Hydrolysefragmente jedoch weiterhin verwehrt. Bemerkenswert erscheint die Tatsache, dass Trypsin mit einer von Vertretern der M4-Familie abweichenden Substratspezifität ebenfalls den hydrolytischen Abbau des durch DAIP modifizierten Zielenzyms katalysiert. Dies legte die Vermutung nahe, dass es bei der Interaktion mit DAIP nicht zwangsweise zur Exposition Autolyse-spezifischer Peptidbindungen kommen muss, sondern, dass sich das Propeller-Protein, ähnlich zur Propeptidhydrolyse, die Anwesenheit exogener Proteasen zunutze macht. <sup>[241]</sup>

Der Abbau der Metalloproteasen kann dabei nicht nur über SDS-PAGE, sondern auch über SYPRO-Orange verfolgt werden, welches seine Anwendung hauptsächlich in der Protein-Färbung und in *Thermal Shift-Assays* findet. <sup>[211, 212]</sup> Der schnelle Anstieg der Fluoreszenz offenbarte die hohe Affinität des Farbstoffes zu Primärfragmenten von Bacillolysin, jedoch nicht zum nativen Enzym selbst. Interessanterweise erfolgte der Anstieg umgehend nach DAIP-Zugabe zu Bacillolysin, was die schnelle Interaktion beider Proteine sowie den Beginn der Autolyse kennzeichnete, wohingegen der Abfall der

---

Fluoreszenz auf die Hydrolyse eben dieser entstandenen Fragmente zurückzuführen war. Ähnliche Beobachtungen konnten auch nach der Zugabe von DAIP zu rBacillolysin-E138A mit Spuren an Trypsin gemacht werden. Bei niedrigen Trypsin-Konzentrationen wurden die kontinuierlich abgebauten farbstoffbindenden Primär-Fragmente jedoch direkt durch neugebildete Fragmente ersetzt, was sich letztlich bei längerer Inkubation in einer konstanten Fluoreszenz-Intensität widerspiegelte. Auch wenn eine quantitative Auswertung der SYPRO-Orange-Analysen aufgrund der parallel ablaufenden Prozesse aus Bildung und Abbau der Primär-Fragmente in Abhängigkeit der hydrolysierenden Protease nicht möglich war, erlaubten die Untersuchungen einen näheren Einblick in den Verlauf der Autolyse. Zudem erwies sich die Kombination aus DAIP, rBacillolysin-E138A und Merocyanin-Farbstoff als ein wertvolles Werkzeug zum Nachweis geringster Mengen proteolytischer Enzyme wie Trypsin.

Die erfolgreiche Kristallisation und Aufklärung des Komplexes bestehend aus DAIP und einem Thermolysin-Fragment ermöglichte erstmals Einblicke in die Interaktionsfläche des Autolyse-induzierenden Proteins mit seinen Zielenzymen. Interessanterweise implizierte die Überlagerung mit dem vollständigen Enzym, dass für eine Assoziation im nativen Komplex signifikante konformationelle Veränderungen der Bindungspartner vorausgesetzt werden müssen. Durch die hohe Rigidität des  $\beta$ -Propeller-Motivs kann daher im Einklang mit den Ergebnissen und den rational abgeleiteten DAIP-Varianten von einer strukturellen Beeinflussung der Protease im Sinne eines *induced fits* ausgegangen werden. Als Beispiel einer durch  $\beta$ -Propeller induzierten strukturellen Modifikation des gebundenen Substrats ist die vierblättrige Hämopexin-Propeller-Domäne der Matrixmetalloprotease MMP-1 zu nennen, welche Collagen durch Entwindung der Tripelhelix für die Hydrolyse durch die katalytische Domäne vorbereitet. <sup>[244, 261]</sup> Wie sich anhand der ITC- und Komplexierungsversuche zeigen ließ, tragen fast alle ausgetauschten Aminosäuren der einzelnen DAIP-Varianten zur Bindung bei. Auch wenn eine einzelne Mutation jeweils die Affinität nur gering beeinflusste, äußerten sich doch Unterschiede in der Stabilität der resultierenden Komplexe sowie den Autolyseraten (E99A, N101A,  $\Delta$ 239-248, N275A). Essentiell für die spezifische Bindung an Thermolysin scheint vor allem Tyr170 zu sein, dessen Austausch gegen Alanin die Komplexbildung vollständig unterband. Bacillolysin und Pseudolysin wiesen hingegen keine Unterschiede im Vergleich zur Interaktion mit *wt*-DAIP auf, weshalb Tyr170 einen Selektivitätsmarker für Thermolysin darstellt. Mit F297 konnte die essentielle Aminosäure in DAIP identifiziert werden, welche Autolyse durch Konformationsänderung zu induzieren scheint und damit den Schalter des Autolysemechanismus darstellt. Ein Austausch des Phenylalanins gegen Alanin erlaubte weiterhin die Assoziation von DAIP mit Thermolysin zu einem stabilen Komplex, verursachte aber den vollständigen Verlust der inhibitorischen und autolysierenden Funktion. Erstaunlicherweise besaß F297A gegenüber Bacillolysin weiterhin volle inhibitorische Aktivität, was insoweit interessant war, als, dass gerade dieser Bereich unter den untersuchten M4-Proteasen hochkonserviert ist. Bindung, Inhibition und Befähigung zur Autolyse-Induktion stellen zwar die Merkmale des DAIP-Mechanismus dar, jedoch hängen diese nur bedingt voneinander ab. Das breite Substratspektrum, zu dem mit

---

Proteasen aus *S. aureus* und *P. aeruginosa* auch Zielmoleküle von hoher pathologischer Relevanz zählen, sowie die gewonnenen Erkenntnisse aus dem DAIP-Mechanismus erlauben es potentiell, durch gezieltes *Protein Engineering* die Spezifität und Wirkung auf weitere Proteine auszuweiten. Zusätzlich hat DAIP durch seine direkte Wirkung auf Aureolysin bzw. Pseudolysin das Potential, die Vermehrung der pathogenen Produzenten und deren Biofilme signifikant zu reduzieren. <sup>[164, 241]</sup>

---

## 6. Literaturverzeichnis

---

1. Labeda, D. P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A. C., Lanoot, B., Vannanneyt, M., Swings, J., Kim, S. B., Liu, Z., Chun, J., Tamura, T., Oguchi, A., Kikuchi, T., Kikuchi, H., Nishii, T., Tsuji, K., Yamaguchi, Y., Tase, A., Takahashi, M., Sakane, T., Suzuki, K. I. & Hatano, K. (2012) Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*, *Antonie Van Leeuwenhoek*. **101**, 73-104.
2. Anne, J. & Van Mellaert, L. (1993) *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production., *FEMS Microbiol Lett.* **114**, 121-128.
3. Poulsen, M., Erhardt, D. P., Molinaro, D. J., Lin, T. L. & Currie, C. R. (2007) Antagonistic bacterial interactions help shape host-symbiont dynamics within the fungus-growing ant-microbe mutualism, *PLoS One*. **2**, e960.
4. Takasuka, T. E., Book, A. J., Lewin, G. R., Currie, C. R. & Fox, B. G. (2013) Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces*, *Sci Rep.* **3**, 1030.
5. Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Nikolova, S. A. & Bogatzewska, N. (2002) Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica., *Journal of Culture Collections.* **3**, 3-14.
6. Kalakoutskii, L. V. & Agre, N. S. (1976) Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes, *Bacteriol Rev.* **40**, 469-524.
7. Hanshaw, A. S., McDonald, B. R., Diaz Diaz, C., Djieto-Lordon, C., Blatrix, R. & Currie, C. R. (2015) Characterization of actinobacteria associated with three ant-plant mutualisms, *Microb Ecol.* **69**, 192-203.
8. van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I. & van Wezel, G. P. (2017) Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes, *FEMS Microbiol Rev.* **41**, 392-416.
9. Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1997) Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers, *Int J Syst Bacteriol.* **47**, 202-6.
10. Präve, P., Faust, U., Sittig, W. & Sukatsch, D. A. (1994) *Handbuch der Biotechnologie*, R. Oldenbourg Verlag München.
11. Eikmanns, M. B., Fischer, R., Requenta, N., Jahn, D., Nethe-Jaenchen, R., Schultze, B. & Steinmann-Keller, D. (2000) *Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
12. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinoiwitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature*. **417**, 141-7.
13. Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L. A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs Jr, W. R., Jr., Venter, J. C. & Fraser, C. M. (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains, *J Bacteriol.* **184**, 5479-90.
14. Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nat Biotechnol.* **21**, 526-31.
15. Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350, *J Bacteriol.* **190**, 4050-60.
16. Redenbach, M. & Altenbuchner, J. (2002) *Warum haben einige Bakterien lineare Chromosomen?*, 2/02 edn, BIOSpektrum.
17. Volff, J. N. & Altenbuchner, J. (1998) Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome, *Mol Microbiol.* **27**, 239-46.



18. Thoma, L. & Muth, G. (2016) Conjugative DNA-transfer in *Streptomyces*, a mycelial organism, *Plasmid*. **87-88**, 1-9.
19. Gerber, N. N. & Lechevalier, H. A. (1965) Geosmin, an Earthy-Smelling Substance Isolated from Actinomycetes., *Appl Microbiol*. **13**, 935-938.
20. Schrempf, H. (2007) *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*.
21. Hopwood, D. A. (2007) *Streptomyces In Nature and Medicine: the Antibiotic Makers*. Oxford, Oxford University Press.
22. Chater, K. F. (1993) Genetics of Differentiation of *Streptomyces*, *Annu Rev Microbiol*. **47**, 685-713.
23. Bruton, C. J., Plaskitt, K. A. & Chater, K. F. (1995) Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol Microbiol*. **18**, 89-99.
24. Kelemen, G. H., Viollier, P. H., Tenor, J., Marri, L., Buttner, M. J. & Thompson, C. J. (2001) A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol Microbiol*. **40**, 804-14.
25. Bibb, M. J., Molle, V. & Buttner, M. J. (2000) Sigma BldN, an Extracytoplasmic Funktion RNA Polymerase Sigma Factor required for Aerial Mycelium Formation in *Str coelicolor* A3(2), *J Bacteriol*. **182**, 4606-4616.
26. Hodgson, D. A. (1992) *Differentiation in actinomycetes*, Cambridge University Press, Cambridge, England.
27. Brana, A. F., Mendez, C., Diaz, L. A., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. (1986) Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*, *J Gen Microbiol*. **132**, 1319-26.
28. Kang, S. G., Kim, I. S., Rho, Y. T. & Lee, K. J. (1995) Production dynamics of extracellular proteases accompanying morphological differentiation of *Streptomyces albidoflavus* SMF301, *Microbiology*. **141**, 3095-3103.
29. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clement, C., Ouhdouch, Y. & van Wezel, G. P. (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria, *Microbiol Mol Biol Rev*. **80**, 1-43.
30. Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F. G., Dijkhuizen, L. & Wosten, H. A. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils, *Genes Dev*. **17**, 1714-26.
31. Capstick, D. S., Willey, J. M., Buttner, M. J. & Elliot, M. A. (2007) SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*, *Mol Microbiol*. **64**, 602-13.
32. Elliot, M. A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M. J., Cohen, S. N., Kao, C. M. & Buttner, M. J. (2003) The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*, *Genes Dev*. **17**, 1727-40.
33. Kim, D. W., Sung Gyun Kang, In Seop Kim, Byong Kyu Lee, Yong Taik Rho, Kye Joon Lee (2006) Proteases and Protease Inhibitors Produced in Streptomycetes and Their Roles in Morphological Differentiation, *J Microbiol Biotechnol*. **16**, 5-14.
34. Kang, S. G., Kenyon, R. G. W., Ward, A. C. & Lee, K. J. (1998) Analysis of differentiation state in *Streptomyces albidoflavus* SMF301 by the combination of pyrolysis mass spectrometry and neural networks, *J Biotechnol*. **62**, 1-10.
35. Jones, S. E., Ho, L., Rees, C. A., Hill, J. E., Nodwell, J. R. & Elliot, M. A. (2017) *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals, *Elife*. **6**.
36. Seong, C., Choi, J. H. & Baik, K. S. (2001) *An Improved Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil*.
37. van der Meij, A., Willemse, J., Schneijderberg, M. A., Geurts, R., Raaijmakers, J. M. & van Wezel, G. P. (2018) Inter- and intracellular colonization of Arabidopsis roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity, *Antonie Van Leeuwenhoek*. **111**, 679-690.
38. Manivasagan, P., Gnanam, S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Vijayalakshmi, S. & Balasubramanian, T. (2010) Studies on Diversity of Marine Actinobacteria from Tamilnadu Part of Bay of Bengal, India., *Libyan Agriculture Research Center Journal International*. **1**, 362-374.

39. Goodfellow, M., Nouioui, I., Sanderson, R., Xie, F. & Bull, A. T. (2018) Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abound in Atacama Desert soils, *Antonie Van Leeuwenhoek*.
40. Kim, B., Sahin, N., Minnikin, D. E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M. & Goodfellow, M. (1999) Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov, *Int J Syst Bacteriol.* **49** Pt 1, 7-17.
41. Waters, C. M. & Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu Rev Cell Dev Biol.* **21**, 319-46.
42. Kroiss, J., Kaltenpoth, M., Schneider, B., Schwinger, M. G., Hertweck, C., Maddula, R. K., Strohm, E. & Svatos, A. (2010) Symbiotic Streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring, *Nat Chem Biol.* **6**, 261-3.
43. Seipke, R. F., Kaltenpoth, M. & Hutchings, M. I. (2012) *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?, *FEMS Microbiol Rev.* **36**, 862-76.
44. Kaltenpoth, M. & Steiger, S. (2014) Unearthing carrion beetles' microbiome: characterization of bacterial and fungal hindgut communities across the Silphidae, *Mol Ecol.* **23**, 1251-67.
45. Currie, C. R. B., A. N. M. Boomsma, J. J. (2003) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites, *Oikos.* **101**, 91-102.
46. Promnuan, Y., Kudo, T., Ohkuma, M. & Chantawannakul, P. (2013) *Streptomyces chiangmaiensis* sp. nov. and *Streptomyces lannensis* sp. nov., isolated from the South-East Asian stingless bee (*Tetragonilla collina*), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **63**, 1896-1901.
47. Kaltenpoth, M. (2009) Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?, *Trends Microbiol.* **17**, 529-35.
48. Kaltenpoth, M., Goettler, W., Dale, C., Stubblefield, J. W., Herzner, G., Roeser-Mueller, K. & Strohm, E. (2006) '*Candidatus Streptomyces philanthi*', an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus* digger wasps, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **56**, 1403-1411.
49. Ramadhar, T. R., Beemelmanns, C., Currie, C. R. & Clardy, J. (2013) Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery, *The Journal Of Antibiotics.* **67**, 53.
50. Xiao, K., Kinkel, L. L. & Samac, D. A. (2002) Biological Control of Phytophthora Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces*, *Biological Control.* **23**, 285-295.
51. Traxler, M. F., Watrous, J. D., Alexandrov, T., Dorrestein, P. C. & Kolter, R. (2013) Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome, *MBio.* **4**.
52. Yang, Y. L., Xu, Y., Straight, P. & Dorrestein, P. C. (2009) Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry, *Nat Chem Biol.* **5**, 885-7.
53. Straight, P. D., Willey, J. M. & Kolter, R. (2006) Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: Role of surfactants in raising aerial structures, *J Bacteriol.* **188**, 4918-25.
54. Vargas-Bautista, C., Rahlwes, K. & Straight, P. (2014) Bacterial competition reveals differential regulation of the pks genes by *Bacillus subtilis*, *J Bacteriol.* **196**, 717-28.
55. Schneider, J., Yepes, A., Garcia-Betancur, J. C., Westedt, I., Mielich, B. & Lopez, D. (2012) Streptomycin-induced expression in *Bacillus subtilis* of YtnP, a lactonase-homologous protein that inhibits development and streptomycin production in *Streptomyces griseus*, *Appl Environ Microbiol.* **78**, 599-603.
56. Stubbendieck, R. M., Brock, D. J., Pellois, J. P., Gill, J. J. & Straight, P. D. (2018) Linearmycins are lytic membrane-targeting antibiotics, *J Antibiot (Tokyo).* **71**, 372-381.
57. Barger, S. R., Hoefler, B. C., Cubillos-Ruiz, A., Russell, W. K., Russell, D. H. & Straight, P. D. (2012) Imaging secondary metabolism of *Streptomyces* sp. Mg1 during cellular lysis and colony degradation of competing *Bacillus subtilis*, *Antonie Van Leeuwenhoek.* **102**, 435-45.
58. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Finn, R. (2016) Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.* **44**, D343-50.
59. Suzuki, M., Taguchi, S., Yamada, S., Kojima, S., Miura, K. I. & Momose, H. (1997) A novel member of the subtilisin-like protease family from *Streptomyces albogriseolus*, *J Bacteriol.* **179**, 430-8.

60. Hiraga, K., Suzuki, T. & Oda, K. (2000) A novel double-headed proteinaceous inhibitor for metalloproteinase and serine proteinase, *J Biol Chem.* **275**, 25173-9.
61. Tate, S., Ohno, A., Seeram, S. S., Hiraga, K., Oda, K. & Kainosho, M. (1998) Elucidation of the mode of interaction of thermolysin with a proteinaceous metalloproteinase inhibitor, SMPI, based on a model complex structure and a structural dynamics analysis, *J Mol Biol.* **282**, 435-46.
62. Sarafeddinov, A., Schmidt, S., Adolf, F., Mainusch, M., Bender, A. & Fuchsbauer, H. L. (2009) A novel transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis* triggers autolysis of neutral metalloproteases, *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 993-9.
63. Muszbek, L., Ariens, R. A., Ichinose, A. & Isth Ssc Subcommittee On Factor, X. (2007) Factor XIII: recommended terms and abbreviations, *J Thromb Haemost.* **5**, 181-3.
64. Greenberg, C. S., Birckbichler, P. J. & Rice, R. H. (1991) Transglutaminases multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues., *The FASEB Journal.* **5**, 3071-77.
65. Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. & Motoki, M. (1989) Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase derived from microorganisms., *Agric Biol Chem.* **53**, 2613-2617.
66. Clarke, D. D., Mycek, M. J., Neidle, A. & Waelsch, H. (1959) The incorporation of amines into protein, *Arch Biochem Biophys.* **79**, 338-354.
67. Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O. & Schuppan, D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease, *Nature Medicine.* **3**, 797.
68. Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C. M. (2002) Transglutaminases: nature's biological glues, *Biochem J.* **368**, 377-96.
69. Lorand, L. & Graham, R. M. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 140-56.
70. Kim, S. Y., Jeitner, T. M. & Steinert, P. M. (2002) Transglutaminases in disease, *Neurochem Int.* **40**, 85-103.
71. Iismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L. & Graham, R. M. (2009) Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders, *Physiol Rev.* **89**, 991-1023.
72. Zhang, D., Wang, M., Wu, J., Cui, L., Du, G. & Chen, J. (2008) Two different proteases from *Streptomyces hygroscopicus* are involved in transglutaminase activation, *J Agric Food Chem.* **56**, 10261-4.
73. Steffen, W., Ko, F. C., Patel, J., Lyamichev, V., Albert, T. J., Benz, J., Rudolph, M. G., Bergmann, F., Streidl, T., Kratzsch, P., Boenitz-Dulat, M., Oelschlaegel, T. & Schraeml, M. (2017) Discovery of a microbial transglutaminase enabling highly site-specific labeling of proteins, *J Biol Chem.* **292**, 15622-15635.
74. Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. & Suzuki, E. (2002) Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*, *J Biol Chem.* **277**, 44252-60.
75. Pedersen, L. C., Yee, V. C., Bishop, P. D., Le Trong, I., Teller, D. C. & Stenkamp, R. E. (1994) Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules, *Protein Sci.* **3**, 1131-5.
76. Hubbard, T. J. P., Ailey, B., Brenner, S. E., Murzin, A. G. & Chothia, C. (1999) SCOP: a structural classification of proteins database., *Nucleic Acids Res.* **27**, 254-256.
77. Makarova, K. S., Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999) A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases, *Protein Sci.* **8**, 1714-9.
78. Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T. F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease, *Nature.* **325**, 458-62.
79. Terada, I., Kwon, S. T., Miyata, Y., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1990) Unique precursor structure of an extracellular protease, aqualysin I, with NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal pro-sequences and its processing in *Escherichia coli*, *J Biol Chem.* **265**, 6576-81.
80. Takagi, M. & Imanaka, T. (1989) Role of the pre-pro-region of neutral protease in secretion in *Bacillus subtilis*, *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **67**, 71-76.

81. Braun, P. & Tommassen, J. (1998) Function of bacterial propeptides, *Trends Microbiol.* **6**, 6-8.
82. Zotzel, J., Keller, P. & Fuchsbaauer, H. L. (2003) Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease, *Eur J Biochem.* **270**, 3214-22.
83. Zotzel, J., Pasternack, R., Pelzer, C., Ziegert, D., Mainusch, M. & Fuchsbaauer, H. L. (2003) Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step, *Eur J Biochem.* **270**, 4149-55.
84. Umezawa, Y., Yokoyama, K., Kikuchi, Y., Date, M., Ito, K., Yoshimoto, T. & Matsui, H. (2004) Novel prolyl tri/tetra-peptidyl aminopeptidase from *Streptomyces mobaraensis*: substrate specificity and enzyme gene cloning, *J Biochem.* **136**, 293-300.
85. Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R. & Kruus, K. (2010) Crosslinking food proteins for improved functionality, *Annu Rev Food Sci Technol.* **1**, 113-38.
86. Nielsen, P. M. (1995) Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents, *Food Biotechnology.* **9**, 119-156.
87. Kuraishi, C., Sakamoto, J. & Soeda, T. (1996) The Usefulness of Transglutaminase for Food Processing in *Biotechnology for Improved Foods and Flavors* pp. 29-38, American Chemical Society.
88. Sakamoto, H., Yamazaki, K., Kaga, C., Yamamoto, Y., Ito, R. & Kurosawa, Y. (1996) Strength Enhancement by Addition of Microbial Transglutaminase during Chinese Noodle Processing, *NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI.* **43**, 598-602.
89. Rachel, N. M. & Pelletier, J. N. (2013) Biotechnological applications of transglutaminases, *Biomolecules.* **3**, 870-88.
90. Dickgiesser, S., Rasche, N., Nasu, D., Middel, S., Horner, S., Avrutina, O., Diederichsen, U. & Kolmar, H. (2015) Self-Assembled Hybrid Aptamer-Fc Conjugates for Targeted Delivery: A Modular Chemoenzymatic Approach, *ACS Chem Biol.* **10**, 2158-65.
91. Fierer, J. O., Veggiani, G. & Howarth, M. (2014) SpyLigase peptide-peptide ligation polymerizes affibodies to enhance magnetic cancer cell capture, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, E1176-81.
92. Siegmund, V., Piater, B., Zakeri, B., Eichhorn, T., Fischer, F., Deutsch, C., Becker, S., Toleikis, L., Hock, B., Betz, U. A. & Kolmar, H. (2016) Spontaneous Isopeptide Bond Formation as a Powerful Tool for Engineering Site-Specific Antibody-Drug Conjugates, *Sci Rep.* **6**, 39291.
93. Appel, M. J. & Bertozzi, C. R. (2015) Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications, *ACS Chem Biol.* **10**, 72-84.
94. Schrodinger, LLC (2015) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 in
95. Tominaga, J., Kemori, Y., Tanaka, Y., Maruyama, T., Kamiya, N. & Goto, M. (2007) An enzymatic method for site-specific labeling of recombinant proteins with oligonucleotides, *Chem Commun (Camb)*, 401-3.
96. Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. & Skerra, A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins, *Protein Eng Des Sel.* **26**, 489-501.
97. Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A. & Veronese, F. M. (2008) Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase, *Adv Drug Delivery Rev.* **60**, 13.
98. Mero, A., Spolaore, B., Veronese, F. M. & Fontana, A. (2009) Transglutaminase-mediated PEGylation of proteins: direct identification of the sites of protein modification by mass spectrometry using a novel monodisperse PEG, *Bioconjug Chem.* **20**, 384-9.
99. Zhao, X., Shaw, A. C., Wang, J., Chang, C. C., Deng, J. & Su, J. (2010) A novel high-throughput screening method for microbial transglutaminases with high specificity toward Gln141 of human growth hormone, *J Biomol Screen.* **15**, 206-12.
100. Sato, H., Hayashi, E., Yamada, N., Yatagai, M. & Takahara, Y. (2001) Further Studies on the Site-Specific Protein Modification by Microbial Transglutaminase, *Bioconjug Chem.* **12**, 701-710.
101. Maullu, C., Raimondo, D., Caboi, F., Giorgetti, A., Sergi, M., Valentini, M., Tonon, G. & Tramontano, A. (2009) Site-directed enzymatic PEGylation of the human granulocyte colony-stimulating factor, *FEBS J.* **276**, 6741-50.



102. Bechtold, U., Otterbach, J. T., Pasternack, R. & Fuchsbauer, H. L. (2000) Enzymic preparation of protein G-peroxidase conjugates catalysed by transglutaminase, *J Biochem.* **127**, 239-45.
103. Kamiya, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Takazawa, T., Takeda, S., Watanabe, K. & Nagamune, T. (2003) S-peptide as a potent peptidyl linker for protein cross-linking by microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*, *Bioconjug Chem.* **14**, 351-7.
104. Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H. & Nagamune, T. (2004) Enzymatic labeling of a single chain variable fragment of an antibody with alkaline phosphatase by microbial transglutaminase, *Biotechnol Bioeng.* **86**, 399-404.
105. Plagmann, I., Chalaris, A., Kruglov, A. A., Nedospasov, S., Rosenstiel, P., Rose-John, S. & Scheller, J. (2009) Transglutaminase-catalyzed covalent multimerization of Camelidae anti-human TNF single domain antibodies improves neutralizing activity, *J Biotechnol.* **142**, 170-8.
106. Junutula, J. R., Flagella, K. M., Graham, R. A., Parsons, K. L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D. L., Li, G., Mai, E., Lewis Phillips, G. D., Hilaragi, H., Fuji, R. N., Tibbitts, J., Vandlen, R., Spencer, S. D., Scheller, R. H., Polakis, P. & Sliwkowski, M. X. (2010) Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer, *Clin Cancer Res.* **16**, 4769-78.
107. Lambert, J. M. (2013) Drug-conjugated antibodies for the treatment of cancer, *Br J Clin Pharmacol.* **76**, 248.
108. Senter, P. D. (2009) Potent antibody drug conjugates for cancer therapy, *Curr Opin Chem Biol.* **13**, 235.
109. Guerin, M., Sabatier, R. & Goncalves, A. (2015) [Trastuzumab emtansine (Kadcyla((R))) approval in HER2-positive metastatic breast cancers], *Bull Cancer.* **102**, 390-7.
110. Zolot, R. S., Basu, S. & Million, R. P. (2013) Antibody-drug conjugates, *Nat Rev Drug Discov.* **12**, 259-60.
111. Wang, L., Amphlett, G., Blattler, W. A., Lambert, J. M. & Zhang, W. (2005) Structural characterization of the maytansinoid-mono-clonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry, *Protein Sci.* **14**, 2436-46.
112. Jackson, D., Atkinson, J., Guevara, C. I., Zhang, C., Kery, V., Moon, S. J., Virata, C., Yang, P., Lowe, C., Pinkstaff, J., Cho, H., Knudsen, N., Manibusan, A., Tian, F., Sun, Y., Lu, Y., Sellers, A., Jia, X. C., Joseph, I., Anand, B., Morrison, K., Pereira, D. S. & Stover, D. (2014) In vitro and in vivo evaluation of cysteine and site specific conjugated herceptin antibody-drug conjugates, *PLoS One.* **9**, e83865.
113. Axup, J. Y., Bajjuri, K. M., Ritland, M., Hutchins, B. M., Kim, C. H., Kazane, S. A., Halder, R., Forsyth, J. S., Santidrian, A. F., Stafin, K., Lu, Y., Tran, H., Seller, A. J., Biroc, S. L., Szydlak, A., Pinkstaff, J. K., Tian, F., Sinha, S. C., Felding-Habermann, B., Smider, V. V. & Schultz, P. G. (2012) Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids, *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**, 16101.
114. Strop, P., Liu, S. H., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R. G., Tran, T. T., Ho, W. H., Farias, S., Casas, M. G., Abdiche, Y., Zhou, D., Chandrasekaran, R., Samain, C., Loo, C., Rossi, A., Rickert, M., Krimm, S., Wong, T., Chin, S. M., Yu, J., Dilley, J., Chaparro-Riggers, J., Filzen, G. F., O'Donnell, C. J., Wang, F., Myers, J. S., Pons, J., Shelton, D. L. & Rajpal, A. (2013) Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates, *Chem Biol.* **20**, 161-7.
115. Farias, S. E., Strop, P., Delaria, K., Galindo Casas, M., Dorywalska, M., Shelton, D. L., Pons, J. & Rajpal, A. (2014) Mass spectrometric characterization of transglutaminase based site-specific antibody-drug conjugates, *Bioconjugate Chem.* **25**, 240.
116. Dennler, P., Chiotellis, A., Fischer, E., Bregeon, D., Belmant, C., Gauthier, L., Lhospice, F., Romagne, F. & Schibli, R. (2014) Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates, *Bioconjug Chem.* **25**, 569-78.
117. Gundersen, M. T., Keillor, J. W. & Pelletier, J. N. (2014) Microbial transglutaminase displays broad acyl-acceptor substrate specificity, *Appl Microbiol Biotechnol.* **98**, 219-30.

118. Taguchi, S., Nishihama, K. I., Igi, K., Ito, K., Taira, H., Motoki, M. & Momose, H. (2000) Substrate specificity analysis of microbial transglutaminase using proteinaceous protease inhibitors as natural model substrates, *J Biochem.* **128**, 415-25.
119. Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N. & Motoki, M. (2000) Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines., *J Agric Food Chem.* **48**, 6230-6233.
120. Coussons, P. J., Price, N. C., Kelly, S. M., Smith, B. & Sawyer, L. (1992) Factors that govern the specificity of transglutaminase-catalysed modification of proteins and peptides, *Biochem J.* **282** ( Pt 3), 929-30.
121. Ohtsuka, T., Ota, M., Nio, N. & Motoki, M. (2000) Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors, *Biosci, Biotechnol, Biochem.* **64**, 2608.
122. Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M. & Hitomi, K. (2008) Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library, *Arch Biochem Biophys.* **477**, 379-83.
123. Lee, J. H., Song, C., Kim, D. H., Park, I. H., Lee, S. G., Lee, Y. S. & Kim, B. G. (2013) Glutamine (Q)-peptide screening for transglutaminase reaction using mRNA display, *Biotechnol Bioeng.* **110**, 353-62.
124. Stachel, I., Schwarzenbolz, U., Henle, T. & Meyer, M. (2010) Cross-linking of type I collagen with microbial transglutaminase: identification of cross-linking sites, *Biomacromolecules.* **11**, 698-705.
125. Spolaore, B., Raboni, S., Ramos Molina, A., Satwekar, A., Damiano, N. & Fontana, A. (2012) Local unfolding is required for the site-specific protein modification by transglutaminase, *Biochemistry.* **51**, 8679.
126. Strop, P., Liu, S. H., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R. G., Tran, T. T., Ho, W. H., Farias, S., Casas, M. G., Abdiche, Y., Zhou, D., Chandrasekaran, R., Samain, C., Loo, C., Rossi, A., Rickert, M., Krimm, S., Wong, T., Chin, S. M., Yu, J., Dilley, J., Chaparro-Riggers, J., Filzen, G. F., O'Donnell, C. J., Wang, F., Myers, J. S., Pons, J., Shelton, D. L. & Rajpal, A. (2013) Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates, *Chem Biol.* **20**, 161.
127. Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grunberg, J., Honer, M., Hunziker, P., Struthers, H. & Schibli, R. (2010) Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase, *Angew Chem Int Ed Engl.* **49**, 9995-7.
128. Gerber, U., Jucknischke, U., Putzien, S. & Fuchsbauer, H. L. (1994) A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*, *Biochem J.* **299** ( Pt 3), 825-9.
129. Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J. T., Robenek, I. R., Wolf, S. & Fuchsbauer, H.-L. (1998) Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* Purification, characterisation and sequence of the zymogen., *Eur J Biochem.* **257**, 570-6.
130. Schmidt, S., Adolf, F. & Fuchsbauer, H. L. (2008) The transglutaminase activating metalloprotease inhibitor from *Streptomyces mobaraensis* is a glutamine and lysine donor substrate of the intrinsic transglutaminase, *FEBS Lett.* **582**, 3132-8.
131. Sarafeddin, A., Arif, A., Peters, A. & Fuchsbauer, H. L. (2011) A novel transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis* inhibiting papain-like cysteine proteases, *J Microbiol Biotechnol.* **21**, 617-26.
132. Zindel, S., Ehret, V., Ehret, M., Hentschel, M., Witt, S., Kramer, A., Fiebig, D., Juttner, N., Frols, S., Pfeifer, F. & Fuchsbauer, H. L. (2016) Involvement of a Novel Class C Beta-Lactamase in the Transglutaminase Mediated Cross-Linking Cascade of *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847, *PLoS One.* **11**, e0149145.
133. Schmidt, S. (2008) *Intrinsische Substratproteine der Transglutaminase von Streptomyces mobaraensis: Identifizierung und Charakterisierung*, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
134. Murao, S., Sato, S. & Muto, N. (1972) Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms., *Agric Biol Chem.* **36**, 1737-1744.
135. Taguchi, S., ERABE, S. K. M., MIURA, K.-i. & MOMOSE, H. (1994) Comparative studies on the primary structures and inhibitory properties of subtilisin-trypsin inhibitors from *Streptomyces*., *Eur J Biochem.* **220**, 911-918.



136. Murai, H., Hara, S., Ikenaka, T., Oda, K. & Murao, S. (1985) Amino acid sequence of *Streptomyces* metalloproteinase inhibitor from *Streptomyces negrescens* TK-23, *J Biochem.* **97**, 173-180.
137. Zindel, S., Kaman, W. E., Frols, S., Pfeifer, F., Peters, A., Hays, J. P. & Fuchsbaue, H. L. (2013) The papain inhibitor (SPI) of *Streptomyces mobaraensis* inhibits bacterial cysteine proteases and is an antagonist of bacterial growth, *Antimicrob Agents Chemother.* **57**, 3388-91.
138. Zindel, S. (2013) *Struktur und Funktion enzymatisch vernetzbarer Proteaseinhibitoren von Streptomyces mobaraensis.*, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
139. Jüttner, N. E. (2018) *Dissertation in Vorbereitung*, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.
140. Ragkousi, K. & Setlow, P. (2004) Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores, *J Bacteriol.* **186**, 5567-75.
141. Kato, J. y., Suzuki, A., Yamazaki, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2002) Control by A-Factor of a Metalloendopeptidase Gene Involved in Aerial Mycelium Formation in *Streptomyces griseus*, *J Bacteriol.* **184**, 6016-6025.
142. Chen, K., Liu, S., Ju, X., Ma, T., Zhang, D., Du, G. & Chen, J. (2010) Effect of transglutaminase-gene disruption in *Streptomyces hygroscopicus* on cell differentiation, *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **50**, 1626-32.
143. Chen, K., Zhang, D., Liu, S., Wang, N. S., Wang, M., Du, G. & Chen, J. (2013) Improvement of transglutaminase production by extending differentiation phase of *Streptomyces hygroscopicus*: mechanism and application, *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**, 7711-9.
144. Yang, H., He, T., Wu, W., Zhu, W., Lu, B. & Sun, W. (2013) Whole-Genome Shotgun Assembly and Analysis of the Genome of *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847, a Strain for Industrial Production of Microbial Transglutaminase, *Genome Announc.* **1**, e0014313.
145. Ebenig, A. (2013) *Katalytische Funktion des Dispersautolyse-induzierenden Proteins aus Streptomyces mobaraensis*, Hochschule Darmstadt.
146. Adekoya, O. A. & Sylte, I. (2009) The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential, *Chem Biol Drug Des.* **73**, 7-16.
147. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1995) Evolutionary families of metallopeptidases, *Methods Enzymol.* **248**, 183-228.
148. Erbeltinger, M., Halling, P. J. & Ni, X. (2001) Scale-up of enzymatic solid-to-solid peptide synthesis and enzyme recovery, *AIChE Journal.* **47**, 500-508.
149. Ager, D. J., Pantaleone, D. P., Henderson, S. A., Katritzky, A. R., Prakash, I. & Walters, D. E. (1998) Commercial, Synthetic Nonnutritive Sweeteners, *Angewandte Chemie International Edition.* **37**, 1802-1817.
150. Ulijn, R. V., Baragana, B., Halling, P. J. & Flitsch, S. L. (2002) Protease-catalyzed peptide synthesis on solid support, *J Am Chem Soc.* **124**, 10988-9.
151. Petrillo, E. W., Jr. & Ondetti, M. A. (1982) Angiotensin-converting enzyme inhibitors: medicinal chemistry and biological actions, *Med Res Rev.* **2**, 1-41.
152. Haki, G. D. & Rakshit, S. K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresour Technol.* **89**, 17-34.
153. Durham, D. R. (1990) The unique stability of *Vibrio proteolyticus* neutral protease under alkaline conditions affords a selective step for purification and use in amino acid-coupling reactions, *Appl Environ Microbiol.* **56**, 2277-81.
154. Durham, D. R., Fortney, D. Z. & Nanney, L. B. (1993) Preliminary evaluation of vibriolysin, a novel proteolytic enzyme composition suitable for the debridement of burn wound eschar, *J Burn Care Rehabil.* **14**, 544-51.
155. Nanney, L. B., Fortney, D. Z. & Durham, D. R. (1995) Effect of vibriolysin, an enzymatic debridging agent, on healing of partial-thickness burn wounds, *Wound Repair Regen.* **3**, 442-8; discussion 540-1.
156. Matsumura, T., Yamanaka, T., Hashizume, S., Irie, Y. & Nitta, K. (1975) Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease, *Jpn J Exp Med.* **45**, 377-82.
157. Kitano, Y. & Okada, N. (1983) Separation of the epidermal sheet by dispase, *Br J Dermatol.* **108**, 555-60.

158. Priest, F. G. (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*, *Bacteriol Rev.* **41**, 711-53.
159. Jin, F., Matsushita, O., Katayama, S., Jin, S., Matsushita, C., Minami, J. & Okabe, A. (1996) Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease, *Infect Immun.* **64**, 230-7.
160. Pietrocola, G., Nobile, G., Rindi, S. & Speziale, P. (2017) *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases, *Front Cell Infect Microbiol.* **7**, 166.
161. Smith, A. W., Chahal, B. & French, G. L. (1994) The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*, *Mol Microbiol.* **13**, 153-60.
162. Booth, B. A., Boesman-Finkelstein, M. & Finkelstein, R. A. (1983) *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme, *Infect Immun.* **42**, 639-44.
163. Komori, Y., Nonogaki, T. & Nikai, T. (2001) Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase), *Toxicon.* **39**, 1327-32.
164. Yanagihara, K., Tomono, K., Kaneko, Y., Miyazaki, Y., Tsukamoto, K., Hirakata, Y., Mukae, H., Kadota, J., Murata, I. & Kohno, S. (2003) Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis, *J Med Microbiol.* **52**, 531-5.
165. Azghani, A. O., Miller, E. J. & Peterson, B. T. (2000) Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability, *Lung.* **178**, 261-9.
166. Heck, L. W., Morihara, K., McRae, W. B. & Miller, E. J. (1986) Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase, *Infect Immun.* **51**, 115-8.
167. Holder, I. A. & Wheeler, R. (1984) Experimental studies of the pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa*: elastase, an IgG protease, *Can J Microbiol.* **30**, 1118-24.
168. Okamoto, T., Akaike, T., Suga, M., Tanase, S., Horie, H., Miyajima, S., Ando, M., Ichinose, Y. & Maeda, H. (1997) Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases, *J Biol Chem.* **272**, 6059-66.
169. Osmon, S., Ward, S., Fraser, V. J. & Kollef, M. H. (2004) Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*, *Chest.* **125**, 607-16.
170. Matthews, B. W., Colman, P. M., Jansonius, J. N., Titani, K., Walsh, K. A. & Neurath, H. (1972) Structure of thermolysin, *Nat New Biol.* **238**, 41-3.
171. Matthews, B. W., Weaver, L. H. & Kester, W. R. (1974) The conformation of thermolysin, *J Biol Chem.* **249**, 8030-44.
172. Eijssink, V. G., Matthews, B. W. & Vriend, G. (2011) The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease, *Protein Sci.* **20**, 1346-55.
173. Veltman, O. R., Vriend, G., Berendsen, H. J., Van den Burg, B., Venema, G. & Eijssink, V. G. (1998) A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases, *Biochemistry.* **37**, 5312-9.
174. Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A. & Roques, B. P. (1999) The prosequence of thermolysin acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in *Escherichia coli*, *J Mol Biol.* **285**, 1911-5.
175. Wetmore, D. R., Wong, S. L. & Roche, R. S. (1992) The role of the pro-sequence in the processing and secretion of the thermolysin-like neutral protease from *Bacillus cereus*, *Mol Microbiol.* **6**, 1593-604.
176. Gao, X., Wang, J., Yu, D. Q., Bian, F., Xie, B. B., Chen, X. L., Zhou, B. C., Lai, L. H., Wang, Z. X., Wu, J. W. & Zhang, Y. Z. (2010) Structural basis for the autoprocessing of zinc metalloproteases in the thermolysin family, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 17569-74.
177. Mock, W. L. & Stanford, D. J. (1996) Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism, *Biochemistry.* **35**, 7369-77.
178. Egli, T. W. (1992) *Metal Ions in Biological Systems: Degradation of Environmental Pollutants by Microorganisms and Their Metalloenzymes*, Marcel Dekker, Inc.
179. Monzingo, A. F. & Matthews, B. W. (1984) Binding of N-carboxymethyl dipeptide inhibitors to thermolysin determined by X-ray crystallography: a novel class of transition-state analogues for zinc peptidases, *Biochemistry.* **23**, 5724-9.

180. Yasukawa, K., Kusano, M. & Inouye, K. (2007) A new method for the extracellular production of recombinant thermolysin by co-expressing the mature sequence and pro-sequence in *Escherichia coli*, *Protein Eng Des Sel.* **20**, 375-83.
181. Matthews, B. W. (1988) Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases, *Accounts of Chemical Research.* **21**, 333-340.
182. de Kreijl, A., Venema, G. & van den Burg, B. (2000) Substrate specificity in the highly heterogeneous M4 peptidase family is determined by a small subset of amino acids, *J Biol Chem.* **275**, 31115-20.
183. Fontana, A. (1988) Structure and stability of thermophilic enzymes Studies on thermolysin, *Biophysical Chemistry.* **29**, 181-193.
184. Holmquist, B. & Vallee, B. L. (1974) Metal substitutions and inhibition of thermolysin: spectra of the cobalt enzyme, *J Biol Chem.* **249**, 4601-7.
185. Holland, D. R., Hausrath, A. C., Juers, D. & Matthews, B. W. (1995) Structural analysis of zinc substitutions in the active site of thermolysin, *Protein Sci.* **4**, 1955-65.
186. Tronrud, D. E., Roderick, S. L. & Matthews, B. W. (1992) Structural basis for the action of thermolysin, *Matrix Suppl.* **1**, 107-11.
187. Vilcinskas, A. & Wedde, M. (2002) Insect inhibitors of metalloproteinases, *IUBMB Life.* **54**, 339-43.
188. Kitagishi, K. & Hiromi, K. (1984) Binding between thermolysin and its specific inhibitor, phosphoramidon, *J Biochem.* **95**, 529-34.
189. Voelskow, H. (1989) *Methoden der zielorientierten Stammisolation*, Carls Hanser Verlag, München.
190. Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species., *Internation Journal of Systemativ Bacteriology.* **16**, 313-340.
191. Korn-Wendisch, F. & Kutzner, H. J. (1981) *The family Streptomycetaceae.*, In: F. Korn-Wendisch & H. J. Kutzner, *The Prokaryotes 2*
192. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene.* **96**, 23-8.
193. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51 Pt 1**, 263-73.
194. Shen, A., Lupardus, P. J., Morell, M., Ponder, E. L., Sadaghiani, A. M., Garcia, K. C. & Bogyo, M. (2009) Simplified, enhanced protein purification using an inducible, autoprocessing enzyme tag, *PLoS One.* **4**, e8119.
195. Yasukawa, K., Kusano, M., Nakamura, K. & Inouye, K. (2006) Characterization of Gly-d-Phe, Gly-l-Leu, and d-Phe as affinity ligands to thermolysin, *Protein Expression and Purification.* **46**, 332-336.
196. Walsh, K. A., Burstein, Y. & Pangburn, M. K. (1974) [50] Thermolysin and other neutral metalloendopeptidases in *Methods Enzymol* (Kaplan, N. P., Colowick, N. P., Jakoby, W. B. & Wilchek, M., eds) pp. 435-440, Academic Press.
197. Lottspeich, F., Engels, J. W. & Solodkoff, Z. L. (2012) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.
198. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem.* **150**, 76-85.
199. Shapiro, A. L., Viñuela, E. & V. Maizel, J. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem Biophys Res Commun.* **28**, 815-820.
200. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 680-5.
201. Meyer, T. S. & Lamberts, B. L. (1965) Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips, *Biochim Biophys Acta.* **107**, 144-5.
202. Frankowski, H., Gu, Y. H., Heo, J. H., Milner, R. & Del Zoppo, G. J. (2012) Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures, *Methods Mol Biol.* **814**, 221-33.
203. Lantz, M. S. & Ciborowski, P. (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases, *Methods Enzymol.* **235**, 563-94.

204. Troeberg, L. & Nagase, H. (2004) Zymography of metalloproteinases, *Curr Protoc Protein Sci.* **Chapter 21**, Unit 21 15.
205. Snoek-van Beurden, P. A. & Von den Hoff, J. W. (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Biotechniques*. **38**, 73-83.
206. Raser, K. J., Posner, A. & Wang, K. K. (1995) Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents, *Arch Biochem Biophys*. **319**, 211-6.
207. Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950) The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine, *J Biol Chem*. **187**, 111-25.
208. Weimer, S., Oertel, K. & Fuchsbaauer, H. L. (2006) A quenched fluorescent dipeptide for assaying dispase- and thermolysin-like proteases, *Anal Biochem*. **352**, 110-9.
209. Lea, W. A. & Simeonov, A. (2011) Fluorescence polarization assays in small molecule screening, *Expert Opin Drug Discov*. **6**, 17-32.
210. Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., Singhal, M., Xu, L., Mendes, P. & Kummer, U. (2006) COPASI--a COMplex PATHway Simulator, *Bioinformatics*. **22**, 3067-74.
211. Steinberg, T. H., Jones, L. J., Haugland, R. P. & Singer, V. L. (1996) SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein, *Anal Biochem*. **239**, 223-37.
212. Huynh, K. & Partch, C. L. (2015) Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay, *Curr Protoc Protein Sci*. **79**, 28 9 1-14.
213. Bundle, D. R. & Sigurskjold, B. W. (1994) [20] Determination of accurate thermodynamics of binding by titration microcalorimetry in *Methods Enzymol* pp. 288-305, Academic Press.
214. Fisher, H. F. & Singh, N. (1995) Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions, *Methods Enzymol*. **259**, 194-221.
215. Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *J Mol Recognit*. **12**, 3-18.
216. Schuck, P. (1997) Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors, *Curr Opin Biotechnol*. **8**, 498-502.
217. Kemeny, D. M. (1994) *Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
218. Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., Ji, X. L. & Liu, S. Q. (2016) Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods, *Int J Mol Sci*. **17**.
219. Martin, L., Schwarz, S., Breitsprecher, D. (2014) Analyzing Thermal Unfolding of Proteins: The Prometheus NT.48., *Application Note NanoTemper Technologies*.
220. Alexander, C. G., Wanner, R., Johnson, C. M., Breitsprecher, D., Winter, G., Duhr, S., Baaske, P. & Ferguson, N. (2014) Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings, *Biochim Biophys Acta*. **1844**, 2241-50.
221. Folk, J. E. & Finlayson, J. S. (1977) The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases, *Adv Protein Chem*. **31**, 1-133.
222. Fiebig, D., Schmelz, S., Zindel, S., Ehret, V., Beck, J., Ebenig, A., Ehret, M., Froels, S., Pfeifer, F., Kolmar, H., Fuchsbaauer, H. L. & Scrima, A. (2016) Structure of the Dispase Autolysis-inducing Protein from *Streptomyces mobaraensis* and Glutamine Cross-linking Sites for Transglutaminase, *J Biol Chem*. **291**, 20417-26.
223. Siegmund, V., Schmelz, S., Dickgiesser, S., Beck, J., Ebenig, A., Fittler, H., Frauendorf, H., Piater, B., Betz, U. A., Avrutina, O., Scrima, A., Fuchsbaauer, H. L. & Kolmar, H. (2015) Locked by Design: A Conformationally Constrained Transglutaminase Tag Enables Efficient Site-Specific Conjugation, *Angew Chem Int Ed Engl*. **54**, 13420-4.
224. Nickerson, N. N., Joag, V. & McGavin, M. J. (2008) Rapid autocatalytic activation of the M4 metalloprotease aureolysin is controlled by a conserved N-terminal fungalsin-thermolysin-propeptide domain, *Mol Microbiol*. **69**, 1530-43.
225. Ghorbel-Bellaaj, O., Hayet, B. K., Bayoudh, A., Younes, I., Hmidet, N., Jellouli, K. & Nasri, M. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase: purification, characterization and biotechnological applications, *Int J Biol Macromol*. **50**, 679-86.



226. Fiebig, D., Storka, J., Roeder, M., Meyners, C., Schmelz, S., Blankenfeldt, W., Scrima, A., Kolmar, H. & Fuchsbauer, H. L. (2018) Destructive twisting of neutral metalloproteases: the catalysis mechanism of the Dispase autolysis-inducing protein from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40487, *FEBS J.* **285**, 4246-4264.
227. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nat Protoc.* **10**, 845-58.
228. Liao, G., Shi, T. & Xie, J. (2012) Regulation mechanisms underlying the biosynthesis of daptomycin and related lipopeptides, *J Cell Biochem.* **113**, 735-41.
229. Kawanami, J., Kimura, A. & Otsuka, H. (1968) Siolipin A: A new lipoamino acid ester isolated from *Streptomyces sioyaensis*, *Biochim Biophys Acta.* **152**, 808-10.
230. Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., Zamboni, M. & Fontana, A. (1986) Autolysis of thermolysin. Isolation and characterization of a folded three-fragment complex, *Eur J Biochem.* **156**, 221-8.
231. van den Burg, B., Eijssink, V. G., Stulp, B. K. & Venema, G. (1990) Identification of autodigestion target sites in *Bacillus subtilis* neutral proteinase, *Biochem J.* **272**, 93-7.
232. Juettner, N. E., Schmelz, S., Bogen, J. P., Happel, D., Fessner, W. D., Pfeifer, F., Fuchsbauer, H. L. & Scrima, A. (2018) Illuminating structure and acyl donor sites of a physiological transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis*, *Protein Sci.* **27**, 910-922.
233. FEBS JFEBS JRachel, N. M., Quaglia, D., Levesque, E., Charette, A. B. & Pelletier, J. N. (2017) Engineered, highly reactive substrates of microbial transglutaminase enable protein labeling within various secondary structure elements, *Protein Sci.* **26**, 2268-2279.
234. Juettner, N. E., Schmelz, S., Kraemer, A., Knapp, S., Becker, B., Kolmar, H., Scrima, A. & Fuchsbauer, H. L. (2018) Structure of a glutamine donor mimicking inhibitory peptide shaped by the catalytic cleft of microbial transglutaminase, *FEBS J.*
235. Bokhove, M., Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., Boekema, E. J. & Oostergetel, G. T. (2013) Chaplins of *Streptomyces coelicolor* self-assemble into two distinct functional amyloids, *J Struct Biol.* **184**, 301-9.
236. Bibb, M. J., Domonkos, A., Chandra, G. & Buttner, M. J. (2012) Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by sigma(BldN) and a cognate anti-sigma factor, RsbN, *Mol Microbiol.* **84**, 1033-49.
237. Parret, A. H., Besir, H. & Meijers, R. (2016) Critical reflections on synthetic gene design for recombinant protein expression, *Curr Opin Struct Biol.* **38**, 155-62.
238. Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A. & Dougherty, W. G. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase, *Anal Biochem.* **216**, 413-7.
239. Peroutka Iii, R. J., Orcutt, S. J., Strickler, J. E. & Butt, T. R. (2011) SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes, *Methods Mol Biol.* **705**, 15-30.
240. Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase, *Gene.* **67**, 31-40.
241. Park, J. H., Lee, J. H., Cho, M. H., Herzberg, M. & Lee, J. (2012) Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal, *FEMS Microbiol Lett.* **335**, 31-8.
242. Chen, C. K., Chan, N. L. & Wang, A. H. (2011) The many blades of the beta-propeller proteins: conserved but versatile, *Trends Biochem Sci.* **36**, 553-61.
243. Hudson, A. M. & Cooley, L. (2008) Phylogenetic, structural and functional relationships between WD- and Kelch-repeat proteins, *Subcell Biochem.* **48**, 6-19.
244. Iyer, S., Visse, R., Nagase, H. & Acharya, K. R. (2006) Crystal structure of an active form of human MMP-1, *J Mol Biol.* **362**, 78-88.
245. Gorrell, M. D. (2005) Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders, *Clin Sci (Lond).* **108**, 277-92.
246. Van Elzen, R. & Lambeir, A. M. (2011) Structure and function relationship in prolyl oligopeptidase, *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **10**, 297-305.

247. Brocca, S., Ferrari, C., Barbiroli, A., Pesce, A., Lotti, M. & Nardini, M. (2016) A bacterial acyl aminoacyl peptidase couples flexibility and stability as a result of cold adaptation, *FEBS J.* **283**, 4310-4324.
248. Chen, C. N., Chin, K. H., Wang, A. H. & Chou, S. H. (2008) The first crystal structure of gluconolactonase important in the glucose secondary metabolic pathways, *J Mol Biol.* **384**, 604-14.
249. Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R. B., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J. L. & Tawfik, D. S. (2004) Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes, *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 412-9.
250. Huang, W. L., Wang, Y. R., Ko, T. P., Chia, C. Y., Huang, K. F. & Wang, A. H. (2010) Crystal structure and functional analysis of the glutaminy cyclase from *Xanthomonas campestris*, *J Mol Biol.* **401**, 374-88.
251. Buchanan, J. D., Corbett, R. J. & Roche, R. S. (1986) The thermodynamics of calcium binding to thermolysin, *Biophys Chem.* **23**, 183-99.
252. Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat Protoc.* **1**, 2876-90.
253. Weber, P. C. & Salemme, F. R. (2003) Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions, *Curr Opin Struct Biol.* **13**, 115-121.
254. Andersen, O. M., Schwarz, F. P., Eisenstein, E., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Etzerodt, M. & Thogersen, H. C. (2001) Dominant thermodynamic role of the third independent receptor binding site in the receptor-associated protein RAP, *Biochemistry.* **40**, 15408-17.
255. Dragan, A. I., Read, C. M. & Crane-Robinson, C. (2017) Enthalpy-entropy compensation: the role of solvation, *Eur Biophys J.* **46**, 301-308.
256. Juettner, N. E., Classen, M., Colin, F., Hoffmann, S. B., Meyners, C., Pfeifer, F. & Fuchsbaue, H. L. (2018) Features of the transglutaminase-activating metalloprotease from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847 produced in *Escherichia coli*, *J Biotechnol.* **281**, 115-122.
257. Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 753-66.
258. Zotzel, J. (2003) *Aktivierung von Transglutaminase von Streptomyces mobaraensis und ihre Regulation*, Technische Universität Darmstadt
259. Xu, C. & Min, J. (2011) Structure and function of WD40 domain proteins, *Protein Cell.* **2**, 202-14.
260. Yin, J., Schoeffler, A. J., Wickliffe, K., Newton, K., Starovasnik, M. A., Dueber, E. C. & Harris, S. F. (2015) Structural Insights into WD-Repeat 48 Activation of Ubiquitin-Specific Protease 46, *Structure.* **23**, 2043-54.
261. Van Doren, S. R. (2015) Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin, *Matrix Biol.* **44-46**, 224-31.



---

## 7. Anhang

---

### 7.1. Gensequenzen

#### DAIP<sub>opt</sub>

ATGGCAGATTCAACGAGCGGCTGGCGTGCCCCGAGCTGTACGAAAGTTACCGGCGATGGTGCTGTTACCTTTACGACGGATG  
ATGGTGCGACGCTGGCACCAGCACGGGTACCCTGCAGAGTGTTCCTACACGCATGGTCTGGTCGCGCTGGATAACCCGAA  
CACGCTGCTGGCCACCCACAATGATGAACGTGCAACGTTCCACCGACGCAGGTTGCACCTGGACGAAAGTGGCCACCCTGGGT  
TCAGGTTTCGACCTGGCTGACGGCAGCAACCGGCGGTCTGTCGTTTGCTGGGAGAAAAACGGCGGTTATCTGGCACGTGTCTG  
ATGGTCGCACCGTGACGAACTGAGCTCTCCGAGCGCCGACATTGTGCGCGTGGGTACCGATAAAGCACGTGCGGACCATGT  
GCGTCTGGCTGGCAGCGATGGTCAGCTGTACGATTCTACGGACGCAGGCGCTACCTGGAAACCGCTGGGTAAACTGGCATT  
GGCCCGGTGCTAGTGTATACCGTCTCCTTCGATCCGGCAGATCTGGACCACGCAGTGGCCGGCGGTATGACCACGGGCG  
GTGCAGTTACCACGGATGGCGGTGCAACCTGGACGGCAGCTACGGGTCTGAGTGCAACCGCTGGCGGTAAATCCAACCTGTT  
CGCGGCCAGCGTCTCTCCGGCAGATCGCAATGTGGTTTACGCTCTGGGTATTGACCTGGTTGAAGCAGCTCCGAACTCAGGC  
GCGGAAGGTCGTCTGTACCGCTCGACCGATGGCGGTCTGACCTATACGCGCATCGTGGATGACACGCCGGACACCGAAC  
TGACGAACTCAACCTGCTGGCACCCTGCGCGGTGGATCCGAATGTTCTGTATTTTGAATACGGCACCTATTTCCAAGCGTA  
TGGCACCAGATCTGTATCGTTACGACGCTCGCACGGGCAAAGTTGGTAAAACCCATAATGCCACAGATGGCATTAGCGCGATC  
GCCTTCAATCCGGCAGCCCCGTCGGTTATGTATCTGGGTCTGGAAGAAGTTCAAATTCACCAT

#### nprT<sub>opt</sub>

ATGAAGATGAAGATGAAACTGGCCAGTTTTGGCCCTGGCCGCCGGCCTGGCAGCACAGGTGTTTCTGCCGTATAATGCACTGG  
CCAGTACCGAACATGTGACCTGGAATCAGCAGTTTCAGACCCCGCAGTTTATTAGTGGCGATCTGCTGAAAGTTAATGGCAC  
CAGCCCGGAAGAACTGGTTTATCAGTATGTTGAAAAGAATGAAAACAAGTTCAAGTTCCATGAAAACGCCAAAGATACCCCTG  
CAGCTGAAAAGAAAAGAAAAATGATAATCTGGGCTTCACCTTTATGCGTTTTTCAGCAGACCTATAAAGGCATTCCGGTGTTT  
GCGCAGTTGTTACCAGTCATGTGAAAGATGGTACCCTGACCGCACTGAGTGGTACCCTGATTCCGAATCTGGATACCAAAGG  
TAGTCTGAAAAGCGGCAAAAACTGAGCGAAAAACAGGCCCGCGATATTGCCGAAAAAGATCTGGTTGCCAATGTGACCAAA  
GAAGTTCCGGAATATGAACAGGGCAAAGATACCGAATTTGTGGTTTATGTTAACGGCGATGAAGCAAGCCTGGCCTATGTTG  
TGAATCTGAATTTTCTGACCCCGGAACCGGGTAATTGGCTGTATATTATTGATGCCGTGGATGGCAAATTTCTGAATAAGTT  
TAATCAGCTGGACGCCGCAAAACCGGGTGACGTGAAAAGCATTACCGGTACCAGCACCGTTGGTGTGGGCCGTGGCGTTCTG  
TGCGATCAGAAAAATATTAATACCACCTATAGCACCTACTATTATCTGCAGGATAATACCCGCGCGCATGGCATTTTTACCT  
ATGATGCAAAATATCGCACCCCTGCCGGGCGAGTCTGTGGGCTGATGCAGATAATCAGTTTTTCGCAAGTTATGATGCACC  
GGCAGTTGATGCCCATTTATTATGCAGGTGTTACCTATGATTATTACAAAAATGTGCACAACCGCCTGAGTTATGATGGCAAT  
AATGCCGCCATTTCGCAGTAGCGTTCATTATAGCCAGGGTTATAATAATGCCTTTTGGAATGGTAGCGAAATGGTTTATGGTG  
ACGGCGATGGTCAGACCTTTATTCGCTGAGTGGTGGTATTGATGTGGTGGCCCATGAACTGACCCATGCCGTTACCGATTA  
TACCGCAGGCCTGATCTATCAGAATGAAAGCGGTGCAATTAATGAAGCCATGAGTGATATTTTTGGTACCCTGGTGAAATTT  
TATGCAAATAAGAATCCGATTGGGAAATTTGGTGAAGATGTTTATACCCCGGGTATTAGCGGTGACAGCCTGCGTAGTATGA  
GTGATCCGGCCAAATATGGTGACCCGGATCATTATAGTAAACGTTATACCGGTACCCAGGATAATGGTGGCGTGCATATTAA  
TAGCGGTATTATTAATAAGGCGGCATATCTGATTAGCCAGGGCGGTACCCATTATGGTGTGAGCGTTGTGGGCATTGGTCTG  
GATAAACTGGGTAAAATTTTCTATCGCGCACTGACCCAGTATCTGACCCCGACCAGTAATTTTAGTCAGCTGCGCGCCGCCG  
CCGTGCAGTCAGCAACAGATCTGTATGGTAGCACCAGTCAGGAAGTTGCCAGTGTTAAACAGGCCTTTGATGCAGTTGGTGT  
GAAA

#### aur<sub>opt</sub>

ATGAGTGATACCAATCATAAACCGGCAACCAGCGATATTAATTTTGAAATTACCCAGAAGAGCGATGCCGTGAAAGCCCTGA  
AAGAACTGCCGAAAAGCGAAAATGTTAAAAATCATTACCAGGATTACAGCGTTACCGATGTGAAAACCGATAAAAAAGGCTT  
TACCCATTATACCCTGCAGCCGAGCGTGGATGGCGTTTCATGCCCGGATAAAGAAGTGAAAGTTCATGCAGATAAAAGCGGT  
AAAGTTGTTCTGATTAATGGCGATACCGATGCAAAAAAGGTTAAACCGACCAATAAGGTTACCCTGAGCAAAGATGAAGCCG  
CAGATAAAGCATTCAATGCCGTGAAAATTGATAAAAAATAAGGCCAAAAACCTGCAGGATGATGTGATTAAGGAAAAATAAGGT  
TGAAATCGATGGCGATAGTAATAAGTATATCTATAACATCGAGCTGATCACCGTTACCCCGGAAATTAGCCATTGGAAAGTT  
AAAAATTGACGCAGATACCGGTGCAGTGGTTGAAAAAACCAATCTGGTTAAAGAAGCAGCAGCCACCGGCACCGGTAAAGGTG  
TGCTGGGCGATACCAAAGATATTAATATTAATAGCATCGACGGCGGCTTTAGCCTGGAAGATCTGACCCATCAGGGTAAACT  
GAGCGCTATAATTTTAAATGATCAGACCGGCCAGGCCACCTGATTACCAATGAAGATGAAAATTTTGTGAAGGATGACCAG  
CGCGCAGGCGTGGATGCAAATTATTATGCCAAACAGACCTATGATTACTATAAAAAATACCTTCGGCCGCGAAAGCTATGATA  
ATCATGGCAGCCGATTGTGAGCCTGACCCATGTGAATCATTATGGTGGTCAGGATAATCGCAATAATGCAGCCTGGATTGG  
CGATAAAATGATCTATGGCGATGGCGATGGTCTGACCTTTACCAATCTGAGTGGCGCCAATGATGTGGTTGCCCATGAAATT  
ACCCACGGTGTGACCCAGCAGACCGCAAATCTGGAATATAAAGATCAGAGCGGTGCCCTGAATGAAAGTTTGTAGCGATGTTT  
TTGGTTACTTTGTGGATGATGAAGATTTTCTGATGGGCGAAGATGTTTATACCCCGGGTAAAGAAGGCGATGCACTGCGCAG  
TATGAGTAATCCGGAACAGTTTGGTCAGCCGAGCCACATGAAAGATTATGTGTATACCGAAAAAGACAACGGCGGTGTGCAT  
ACCAATAGTGGTATTCGAATAAGGCCGCATATAATGTGATTTCAGGCCATTGGCAAAAGCAAAAGTGAACAGATCTATTATC  
GCGCACTGACCGAATATCTGACCAGCAATAGCAATTTTAAAGATCTGAAAGACGCACTGTATCAGGCCGCAAAAGATCTGTA  
TGAACAGCAGACCGCCGAACAGGTGTATGAAGCATGGAATGAAGTTGGCGTGGA

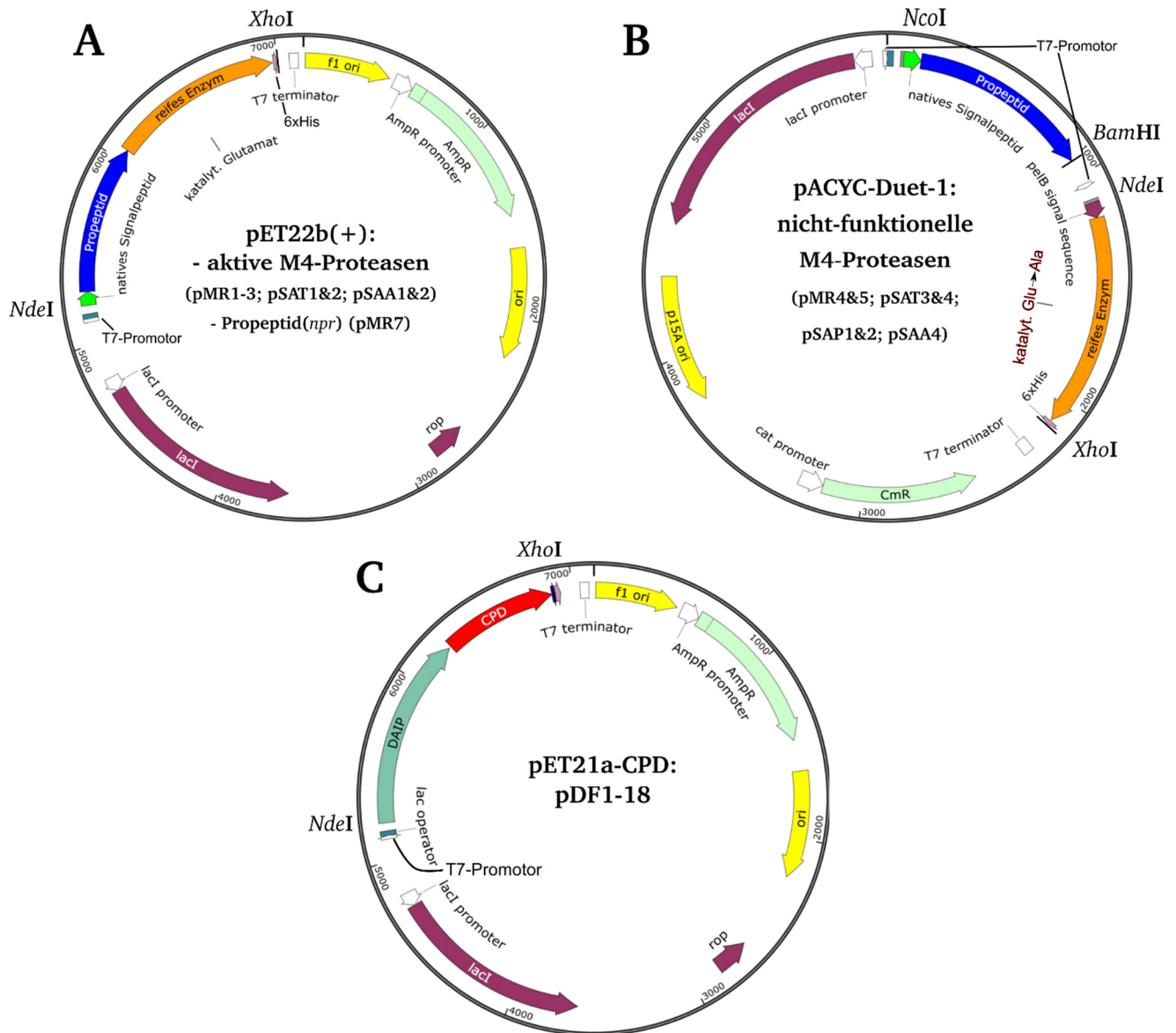
### lasB<sub>opt</sub>-(LOF)

ATGAAGAAGGTTAGCACCCCTGGATCTGCTGTTTGTGGCCATTATGGGCGTGAGCCCCGGCAGCATTTGCCGCAGATCTGATTG  
ATGTTAGTAAACTGCCGAGCAAAGCCGCACAGGGTGCCCCGGGTCCGGTGACCTTACAGGCCGCTGTTGGTGCCGGTGGCGC  
CGATGAAGTAAAGCAATTCGTAGCACCCACCCTGCCGAATGGTAAACAGGTTACCCGTTATGAACAGTTTCATAATGGCGTT  
CGTGTGGTTGGTGAAGCAATTACCGAAGTGAAGGCCCGGGCAAAGTGTGTCAGCCCAGCGCAGTGGTCATTTTGTGGCA  
ATATTGCAGCCGATCTGCCGGGTAGCACCCACCGCCGCTGTGAGCGCTGAACAGGTGCTGGCCCAGGCCAAAAGCCTGAAAGC  
ACAGGGTCGTAAAACCGAAAATGATAAAGTTGAACTGGTTATTTCGTCTGGGTGAAAATAATATTGCCAGCTGGTGTATAAT  
GTAGCTATCTGATTCCGGGTGAAGGTCTGAGTCGCCCGCATTTTGTGATTGATGCCAAAACCGGCGAAGTGCTGGATCAGT  
GGGAAGGTCTGGCACATGCAGAAGCCGGCGGTCCGGGCGGTAATCAGAAAATTGGTAAATATACCTACGGCAGTGATTATGG  
TCCGCTGATTGTTAATGATCGTTGCGAAATGGATGATGGTAATGTGATTACCGTTGATATGAATAGCAGCACCGATGATAGC  
AAAACCACCCCGTTTCGCTTTGCGTGTCCGACCAATACCTATAAACAGGTGAATGGTGCCTATAGCCCCGCTGAATGATGCCC  
ATTTCTTTGGTGGTGTGGTGTAACTGTATCGCGATTGGTTTGGTACCAGTCCGCTGACCCATAAACTGTATATGAAAGT  
GCATTATGGTCGCAGTGTGGAAAATGCCTATTGGGATGGTACCGCCATGCTGTTTGGTGACGGCGCAACCATGTTTTATCCG  
CTGGTGAGCCTGGATGTGGCAGCACATGCAGTTAGCCACGGTTTTACCGAACAGAATAGTGGCCTGATCTATCGCGGTGAGC  
CGGGCGGCATGAATGAAGCATTTTCAGATATGGCAGGCCGAAGCCGCCGAATTTTATATGCGCGGTAAAAATGATTTCTGAT  
TGGTTATGATATCAAGAAAGGTAGTGGCGCACTGCGTTATATGGATCAGCCGAGCCGCGATGGCCGCAGCATTGATAATGCA  
AGCCAGTATTATAATGGCATTGATGTTTCATCATAGCAGCGGTGTGTATAATCGTGCCTTTTATCTGCTGGCAAATAGTCCGG  
GTTGGGATACCCGTAAAGCCTTTGAAGTGTGTGGATGCCAATCGTTATTATTGGACCGCCACCAGCAATTATAATAGTGG  
CGCTGCGGTGTGATTTCGCAGCGCACAGAATCGCAATTATAGTGCCGCAGATGTGACCCGTGCCTTTAGTACCGTGGGTGTG  
ACCTGCCCCGAGTGCACTG

### npr (aus DSM-36)

ATGAAAAAAGTATGGTTTTTCGCTTCTTGGAGGAGCTATGTTATTAGGGTCTGTGGCGTCTGGTGCATCTGCGGAGAGTTCCG  
TTTCGGGACCAGCACAGCTTACACCGACCTTCCACGCCGAGCAATGGAAAGCTCCTTCCTCGGTATCAGGGGACGACATTGT  
ATGGAGCTATTTGAATCGACAAAAGAAATCGTTACTGGGTGTGGATAGCTCCAGTGTACGTGAACAATTCCGAATCGTTGAT  
CGCACAAGCGACAAGTCCGGTGTGAGCCATTATCGACTGAAGCAGTATGTAAACGGGATTCGCCGTATATGCGAGCTGAGCAAA  
CTATTTCATGTGGGCAAATCTGGTGAAGTCACTCTTACTTAGGAGCGGTGATTAATGAGGATCAGCAGGAAGAAGCTACGCA  
AGGTACAACTCCAAAAATCAGCGCTTCTGAAGCGGTTTACACCGCATATAAAGAAGCAGCTGCACGGATTGAAGCCCTCCCT  
ACCTCCGACGATACTATTTCTAAAGACGCTGAGGAGCCAAGCAGTGTAAGTAAAGATACTTACGCCGAAGCAGCTAACAACG  
ACAAAACGCTTCTTATGATAAGGACGAGCTGAGTCTTGATAAGGCATCTGTCTGAAAGATAGCAAAATTGTAGCAGTGGA  
GGCCGAAAAAAGTTCCATTGCCAAAATCGCTAATCTACAGCCTGAAGTAGATCCTAAAGCAGAACTCTACTACTACCTAAA  
GGGGATGACCTGCTGCTAGTTTATGTGACAGAAGTTAATGTTTTAGAACCTGCCCCACTGCGTACCCGCTACATTATTGATG  
CCAATGACGGCAGCATCGTATTCAGTATGACATCATTAATGAAGCGACAGGCACAGGTAAAGGTGTGCTTGGTGATTCCAA  
ATCGTTCACTACTACCGCTTCCGGCAGTAGCTACCAGTTAAAAGATACCACACGCGGTAACGGTATCGTGACTTACACGGCC  
TCCAACCGCAAAGCATCCCAGGCACCTTTTTCAGAGATGCTGATAATGTATGGAATGATCCAGCCGGTGTGGATGCCCATG  
CGTATGCTGCCAAAACCTATGATTACTATAAATCCAAATTTGGACGCAACAGCATTGACGGACGTGGTCTGCAACTCCGTTT  
GACAGTCCATTACGGCAGCCGCTACAACAACGCTTTCTGGAACGGCTCCCAAATGACTTATGGAGATGGAGACGGTAGCACA  
TTTATCGCCTTCAGCGGGGACCCCGATGTAGTAGGGCATGAACCTACACATGGTGTACAGAGTATACTTCGAATTTGGAAT  
ATTACGGAGAGTCCGGCGCATTTGAATGAGGCTTCTCGGACGTTATCGGTAATGACATTCAACGCAAAAACCTGGCTTGTAGG  
CGATGATATTTACACGCCAAACATTGCGGGCGATGCCCTTCGCTCAATGTCCAATCCTACTCTGTACGATCAACCAGATCAC  
TATTTCAACCTGTATAAAGGCAGCTCCGATAACGGCGGCGTTCATACAAACAGCGGTATTATCAATAAAGCCTACTACTTGT  
TGGCACAAGGCGGTACTTTCCATGGCGTTACTGTAAATGGAATTGGCCGCGATGCTGCGGTGCAAAATTTATTATAGTGCCTT  
TACGAACTACCTGACTTCTTCTCCGACTTCTCCAACGCACGTGCTGTGATCCAAGCCGCAAAAGATCTGTACGGGGCG  
AACTCAGCAGAAGCAACTGCAGCTGCTAAGTCTGGTGACGCTGTAGGC

## 7.2. Plasmidkarten

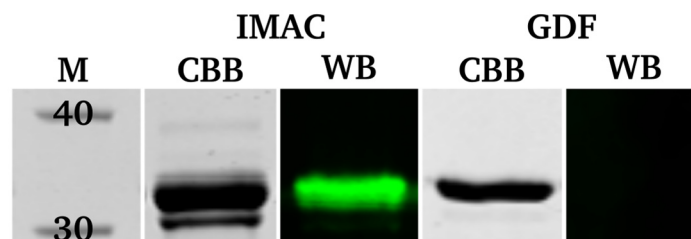


**Abb. 7.1** Expressionsplasmidkarten für die rekombinante Produktion von aktiven (A) und nicht-funktionellen M4-Metalloproteasen (B) und DAIP (C). A, die Klonierung zur Herstellung der Expressionsplasmide für die Produktion aktiver M4-Metalloproteasen erfolgte durch Ligation der codierenden Sequenzen des nativen Signalpeptids, Propeptids und reifen Enzyms über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI*. B, die Klonierung zur Herstellung der Expressionsplasmide für die Produktion nicht-funktioneller M4-Metalloproteasen erfolgte durch Ligation der codierenden Sequenzen des nativen Signalpeptids und Propeptids in die MCS-1 über *NcoI* und *BamHI*. Nach Austausch des für das katalyt. Glutamat codierende Codon gegen ein Alanin-codierendes Codon erfolgte die Ligation der Sequenz des reifen Enzyms mit vorgeschaltetem pelB-Signalpeptid über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in die auf dem Vektor räumlich getrennte MCS-2. Die Expression des DAIP und dessen Varianten (C) erfolgte als Fusion mit der Cysteinprotease-Domäne (CPD) nach Ligation der codierenden Sequenzen über *NdeI* und *XhoI*. Die Annotation der Signalpeptid-, Propeptid- und Enzym/Protein-Sequenzen ist Abschnitt 3.1.6 zu entnehmen. *lacI* operator, Bindestelle für Lac-Repressor *lacI*; *lacI*, *LacI*-Repressor-Gen; *f1 ori*, ori, *p15A ori*, untersch. Replikationsursprünge; *AmpR*, Beta-Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenz); *CmR*, Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen (Chloramphenicol-Resistenz); *rop*, *rop*-Protein; *pelB*, *pelB*-Signalpeptidsequenz; *nSP*, native Protease-Signalpeptidsequenz. CPD, Cystein-Protease-Domäne aus *V. cholerae*.

### 7.3. Zusätzliche Abbildungen

npr (DSM-36)	ESSVSGPAQLTPTFHA <b>AE</b> QWKAPSSVSGDDIVWSYLN <b>RQ</b> KKSL <b>LG</b> VDS <b>SS</b> VRE <b>Q</b> FRIVDRT	60
P29148	ESSVSGPAQLTPTFHT <b>EQ</b> WKAPSSVSGDDIVWSYLN <b>RQ</b> KKSL <b>LG</b> VDS <b>SS</b> VRE <b>Q</b> FRIVDRT	60
	*****:*****	
npr (DSM-36)	SDKSGVSHYRLKQYVNGIPVYGAEQTIHV <b>GK</b> SGEVTSYLGAVINEDQ <b>Q</b> EEATQGTTPKIS	120
P29148	SDKSGVSHYRLKQYVNGIPVYGAEQTIHV <b>GK</b> SGEVTSYLGAVINEDQ <b>Q</b> EEATQGTTPKIS	120
	*****:*****	
npr (DSM-36)	ASEAVYTAYKEAAARIEALPTSDDTISKDAE <b>EP</b> SSVSKDTYAEAA <b>NN</b> DKT <b>LS</b> DKDEL <b>SL</b>	180
P29148	ASEAVYTAYKEAAARIEALPTSDDTISKDAE <b>EP</b> SSVSKDTYAEAA <b>NN</b> DKT <b>LS</b> V <b>DK</b> DEL <b>SL</b>	180
	*****:*****	
npr (DSM-36)	DKASVLKDSKI <b>VA</b> VEAEKSSIAKIANLQPEVD <b>PK</b> AELYYPKGDDLLLVYVTEVNVLEPA	240
P29148	DKASVLKDSKI <b>EA</b> VEAEKSSIAKIANLQPEVD <b>PK</b> AELYYPKGDDLLLVYVTEVNVLEPA	240
	***** *****	
npr (DSM-36)	PLRTRYIIDANDGSIVFYDIINEAT <b>GT</b> GKGV <b>LG</b> DSKSFTTTASGSSYQLKD <b>TT</b> RGNGIV	300
P29148	PLRTRYIIDANDGSIVFYDIINEAT <b>--</b> GKGV <b>LG</b> DSKSFTTTASGSSYQLKD <b>TT</b> RGNGIV	298
	***** *****	
npr (DSM-36)	TYTASNRQ <b>S</b> IPG <b>TL</b> LDADNVW <b>ND</b> PAGVDAHAYAAKTYD <b>Y</b> YK <b>SK</b> FGRNSIDGRGLQ <b>LR</b> ST	360
P29148	TYTASNRQ <b>S</b> IPG <b>TL</b> LDADNVW <b>ND</b> PAGVDAHAYAAKTYD <b>Y</b> YK <b>SK</b> FGRNSIDGRGLQ <b>LR</b> ST	358
	***** *****	
npr (DSM-36)	VHYGSRYNNAFWNGSQMTYGDG <b>--</b> DGSTFIAFSGDPDVVGHE <b>LT</b> HGVTEYTSNLEYYGES	418
P29148	VHYGSRYNNAFWNGSQMTYGDG <b>BD</b> DGSTFIAFSGDPDVVGHE <b>LT</b> HGVTEYTSNLEYYGES	418
	***** *****	
npr (DSM-36)	GALNEAFSDVIGNDIQRKNWLVGDDIYTPNI <b>AG</b> DALRSM <b>SN</b> PTLYDQ <b>P</b> DHYSNLYKGSSD	478
P29148	GALNEAFSDVIGNDIQRKNWLVGDDIYTPNI <b>CG</b> DALRSM <b>SN</b> PTLYDQ <b>P</b> HYSNLYKGSSD	478
	*****:*****	
npr (DSM-36)	NGGVHTNSGIINKAYYLLAQGGTFHGVTVNGIGRDAAVQIY <b>Y</b> SAFTNYLTSSSD <b>FS</b> NARA	538
P29148	NGGVHTNSGIINKAYYLLAQGGTFHGVTVNGIGRDAAVQIY <b>Y</b> SAFTNYLTSSSD <b>FS</b> NARA	538
	*****	
npr (DSM-36)	AVIQAAKDLYGANS <b>AE</b> ATAAAKSFD <b>AV</b> G	566
P29148	AVIQAAKDLYGANS <b>AE</b> ATAAAKSFD <b>AV</b> G	566
	*****	

**Abb. 7.2 Sequenzalignment des *npr*-Genprodukts aus *P. polymyxa* DSM-36 mit dem Uniprot-Eintrag P29148.** Das Alignment der translatierten codierenden Sequenzen für Bacillolysin aus *P. polymyxa* DSM-36 mit der bei Uniprot hinterlegten Sequenz (P29148) erfolgte mit Clustal-Omega. Abweichungen sind entsprechend farblich gekennzeichnet.



**Abb. 7.3 Hexahistidin-Tag-Verlust von rThermolysin-His<sub>6</sub> im Verlauf der Aufarbeitung durch autokatalytische Hydrolyse.** Die vereinigten Fraktionen von rThermolysin-His<sub>6</sub> nach IMAC (erster Reinigungsschritt) und nach Gly-DPhe-Chromatographie (zweiter Reinigungsschritt) wurden über SDS-PAGE (12.5%) aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit CBB bzw. nach Western Blot (WB) immunchemisch mit polyklonalen anti-His Erstantikörpern. M, Molekulargewichtsmarkermischung.

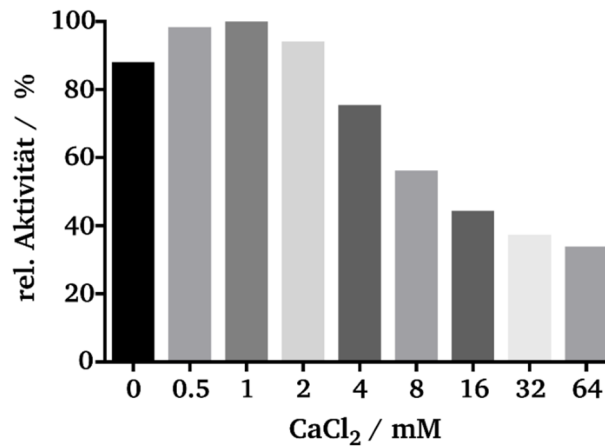


Abb. 7.4 Inhibierende Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die *DabSFans*-Hydrolyse von rBacillolysine bei pH 7.5. 100 nM rBacillolysine in 50 mM Tris pH 7.5 wurden mit den angegebenen Konzentrationen  $\text{CaCl}_2$  (0-64 mM) für 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend die Restaktivität über *DabSFans*-Hydrolyse bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm) und 30 °C ermittelt.

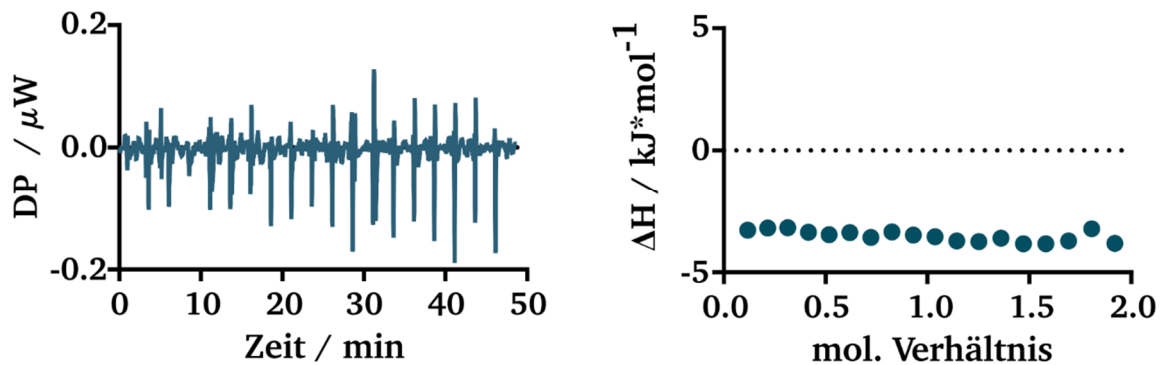


Abb. 7.5 Isotherme Titrationskalorimetrie von DAIP und dem nicht-funktionellen Zymogen *Pro-rBacillolysine*-E138A bei pH 8.0. 100  $\mu\text{M}$  DAIP wurden über 2- $\mu\text{L}$ -Injektionen zu 10  $\mu\text{M}$  *Pro-rBacillolysine*-E138A in 50 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 30 °C titriert. Die Rohdaten der Wärmeänderung über die Zeit (links) wurde durch die PEAQ-ITC Analyse-Software integriert (rechts).

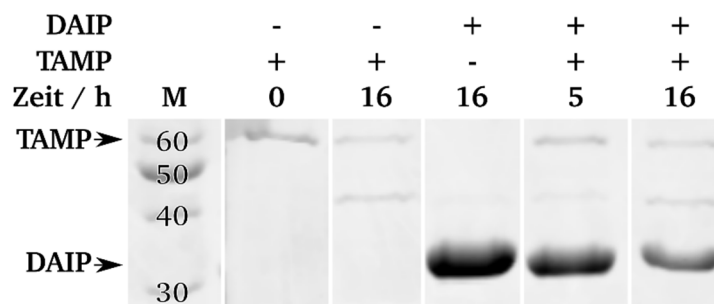
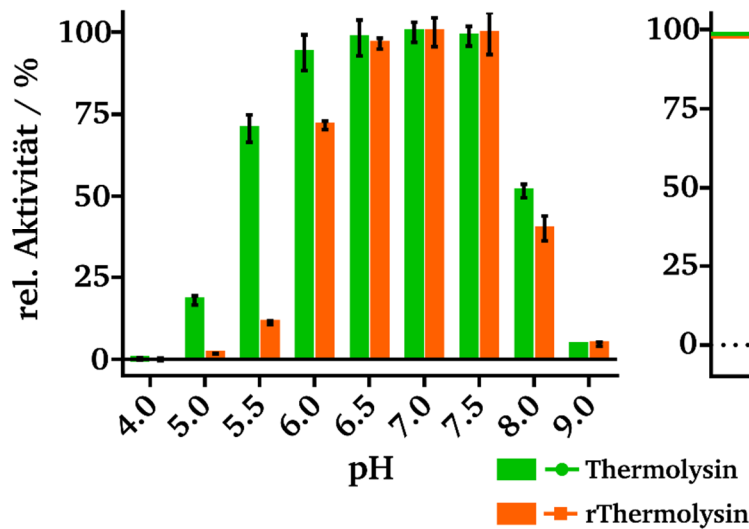
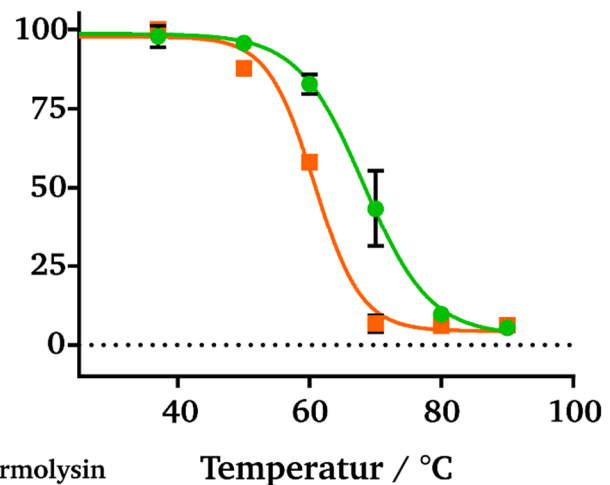
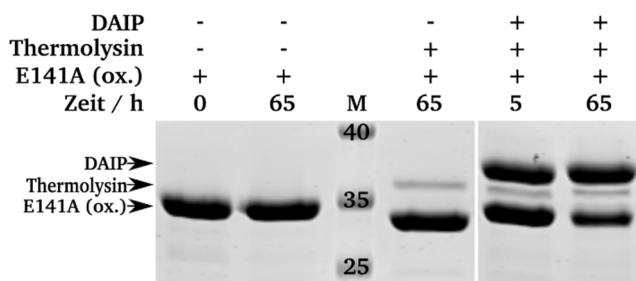
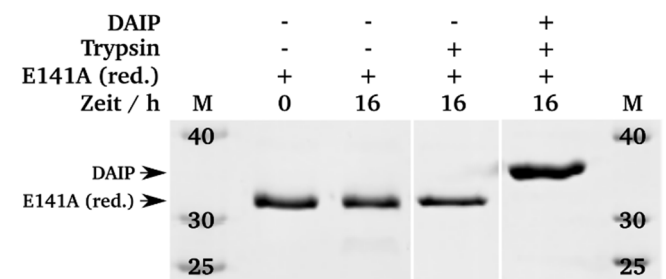


Abb. 7.6 Proteolytischer Abbau von DAIP durch die M4-Metalloprotease rTAMP aus *S. mobaraensis* bei pH 8.0. 0.5  $\mu\text{M}$  TAMP und 20  $\mu\text{M}$  DAIP wurden für bis zu 16 h bei 37 °C in 50 mM Tris pH 8.0 mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  inkubiert. Die Hydrolyse wurde entsprechend durch Denaturierung bei 95 °C beendet und die Proben über SDS-PAGE (12.5%) aufgetrennt. M, Molekulargewichtsmarkermischung.

**A****B**

**Abb. 7.7 pH-Optima und Temperaturstabilität von rekombinantem und nativem Thermolysin.** A, pH-Optimum. 5 nM Thermolysin bzw. 2 nM rThermolysin wurden jeweils mit entsprechendem Puffer und 5 mM CaCl<sub>2</sub> auf den angegebenen pH zwischen 4.0 und 9.0 eingestellt und anschließend die Aktivität über *DabsFans*-Hydrolyse bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm) bei 37 °C mit N=3 ermittelt. Die Auftragung erfolgte normiert auf die jeweilige Kontrolle bei pH 7.0. B, Temperaturstabilität von rekombinantem und Wildtyp-Thermolysin. 1400 nM der Protease wurden zunächst 60 min in 50 mM Tris pH 7.0 mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> bei 37-90 °C inkubiert und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. Die Bestimmung der Restaktivität erfolgte nach 10 min Vortemperieren von jeweils 70 nM Thermolysin bzw. 300 nM rThermolysin bei 37 °C durch Zugabe von Azocasein für 20 min. Die Reaktion wurde abschließend durch Zugabe von 10%iger TCA beendet und die Extinktion bei 420 nm bestimmt. Die Auftragung erfolgte normiert auf die jeweilige Positivkontrolle bei 37 °C. Die Einstellung des pHs erfolgte zwischen 4.0 und 5.5 mit 100 mM Na-Acetat, von 6.0-7.0 mit 100 mM Bis-Tris und zwischen pH 7.5 und 9.0 mit 100 mM Tris.

**A****B**

**Abb. 7.8 DAIP-vermittelte Hydrolyse von oxidiertem und reduziertem rPseudolysin-E141A durch exogene Proteasen bei pH 8.0.** A, DAIP-induzierte Hydrolyse von rPseudolysin-E141A durch Thermolysin. 10  $\mu$ M rPseudolysin-E141A (ox.) wurden zusammen mit 1  $\mu$ M Thermolysin und 8  $\mu$ M DAIP in 50 mM Tris pH 8.0 mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> für bis zu 65 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung. B, DAIP-induzierte Hydrolyse von reduziertem rPseudolysin-E141A durch Trypsin. 5  $\mu$ M reduziertes, disulfidfreies rPseudolysin-E141A wurden zusammen mit 1  $\mu$ M Trypsin und 6  $\mu$ M DAIP in 50 mM Tris pH 8.0 mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> für bis zu 16 h bei 37 °C inkubiert und anschließend über SDS-PAGE und CBB-Färbung aufgetrennt und visualisiert.



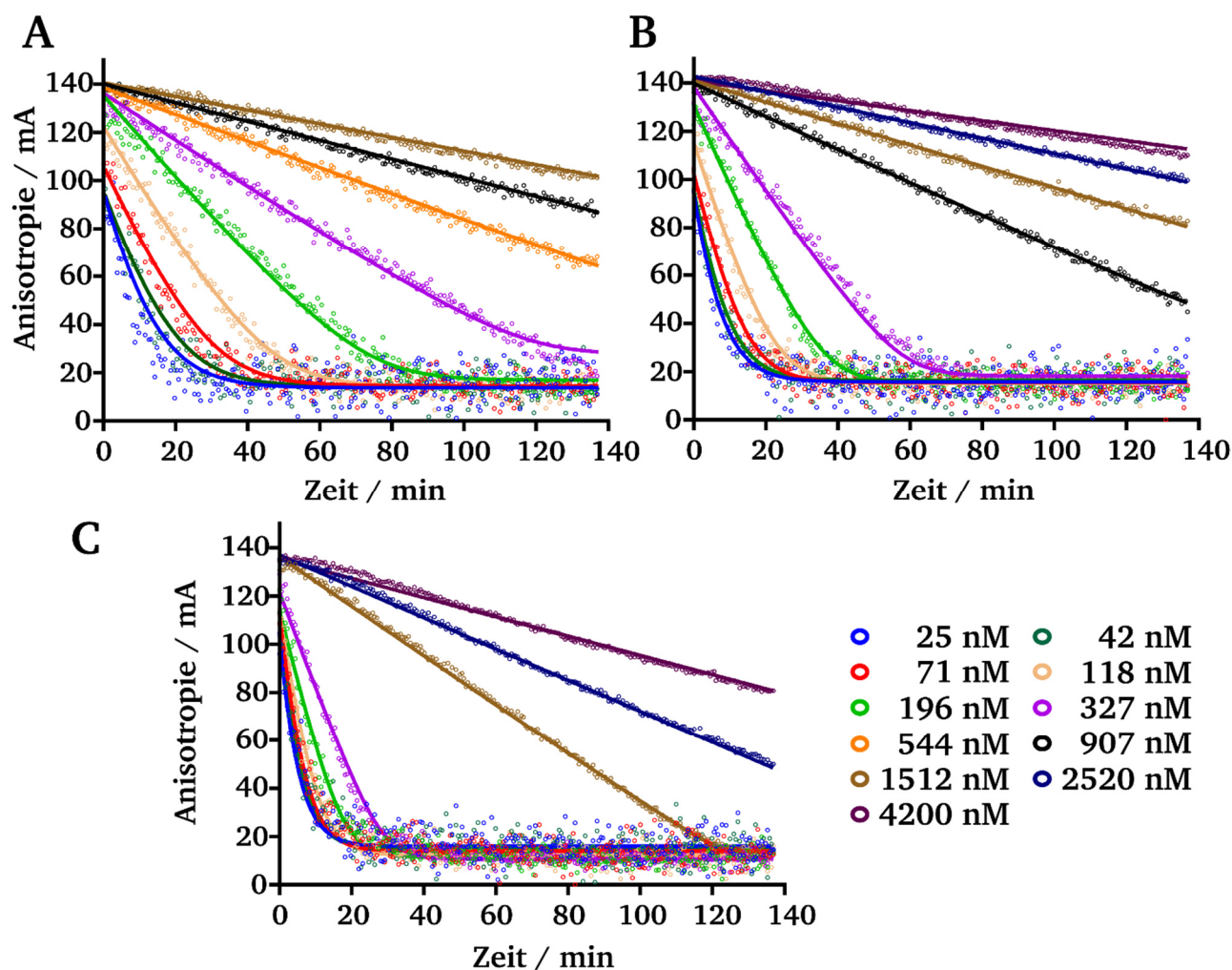


Abb. 7.9 Trypsin-vermittelte Hydrolyse von rBacillolysin-E138A-FITC nach Interaktion mit DAIP bei pH 7.5. 25–4200 nM rBacillolysin-E138A-FITC, 25  $\mu$ M Trypsin in 50 mM Tris pH 7.5 und 2 mM  $\text{CaCl}_2$  wurden mit 10 nM (A), 20 nM (B) oder 40 nM (C) DAIP bei 30 °C vereinigt. Die Hydrolyse wurde über die Änderungen der Fluoreszenzpolarisation bei 520 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  485 nm) verfolgt und mit den durch das COPASI-Modell generierten Daten überlagert. <sup>[210]</sup>

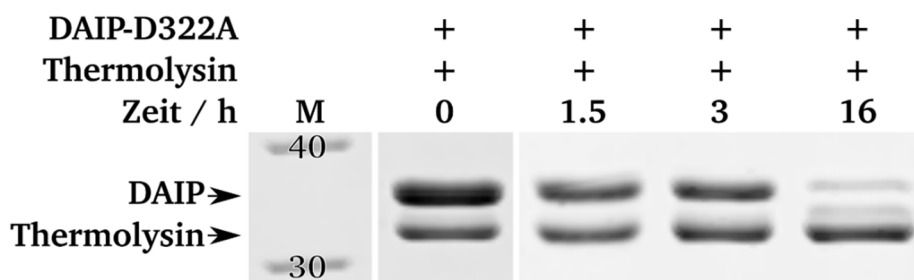


Abb. 7.10 Alanin-Substitution von Asp322 in DAIP führt zu gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau durch Thermolysin. 8  $\mu$ M Thermolysin wurden zusammen mit 10  $\mu$ M DAIP in 50 mM Tris pH 8.0 mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  für bis zu 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung und Visualisierung der Proben erfolgte über SDS-PAGE (12.5%) und CBB-Färbung.

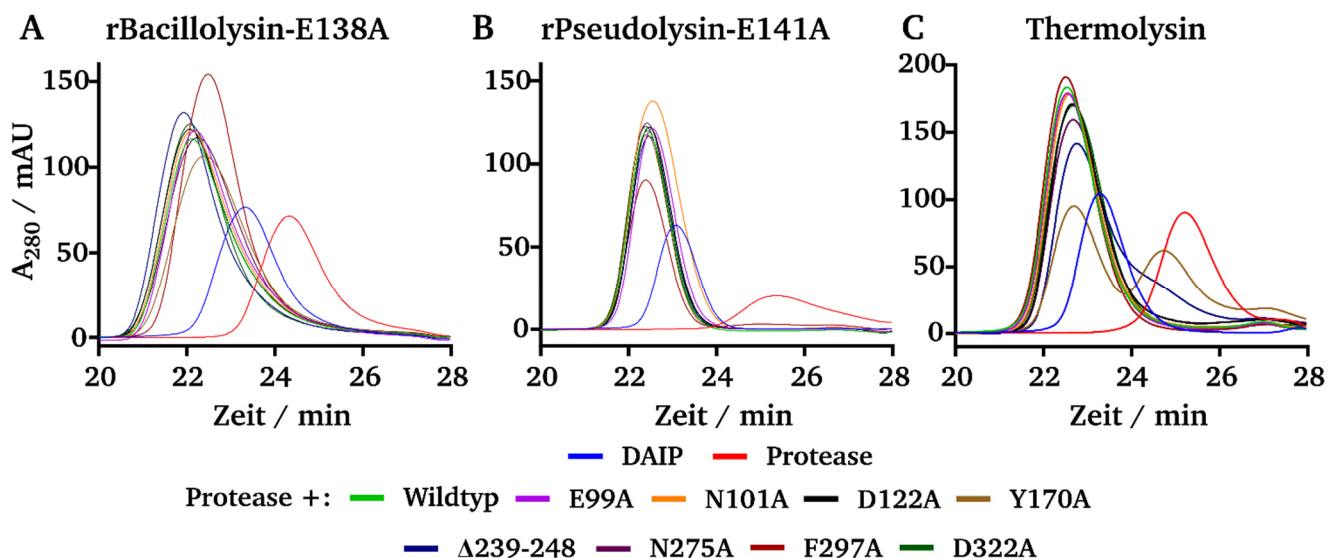


Abb. 7.11 Unterschiedliche Elutionsprofile der aus dem Komplex abgeleiteten DAIP-Varianten bei Superdex 200-GPC nach Interaktion mit rBacillolysin-E138A (A), rPseudolysin-E141A (B) oder Thermolysin (C) bei pH 8.0. 10  $\mu$ M rBacillolysin-E138A (A), rPseudolysin-E141A (B) oder 15  $\mu$ M Thermolysin (C) wurden mit 10  $\mu$ M (A, B) bzw. 15  $\mu$ M einer DAIP-Variante (C) vereinigt und über Superdex 200 (3.2/300 *increase*, 2.4 ml) bei 75  $\mu$ l $\cdot$ min $^{-1}$  in 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl und 10 mM CaCl $_2$  getrennt.

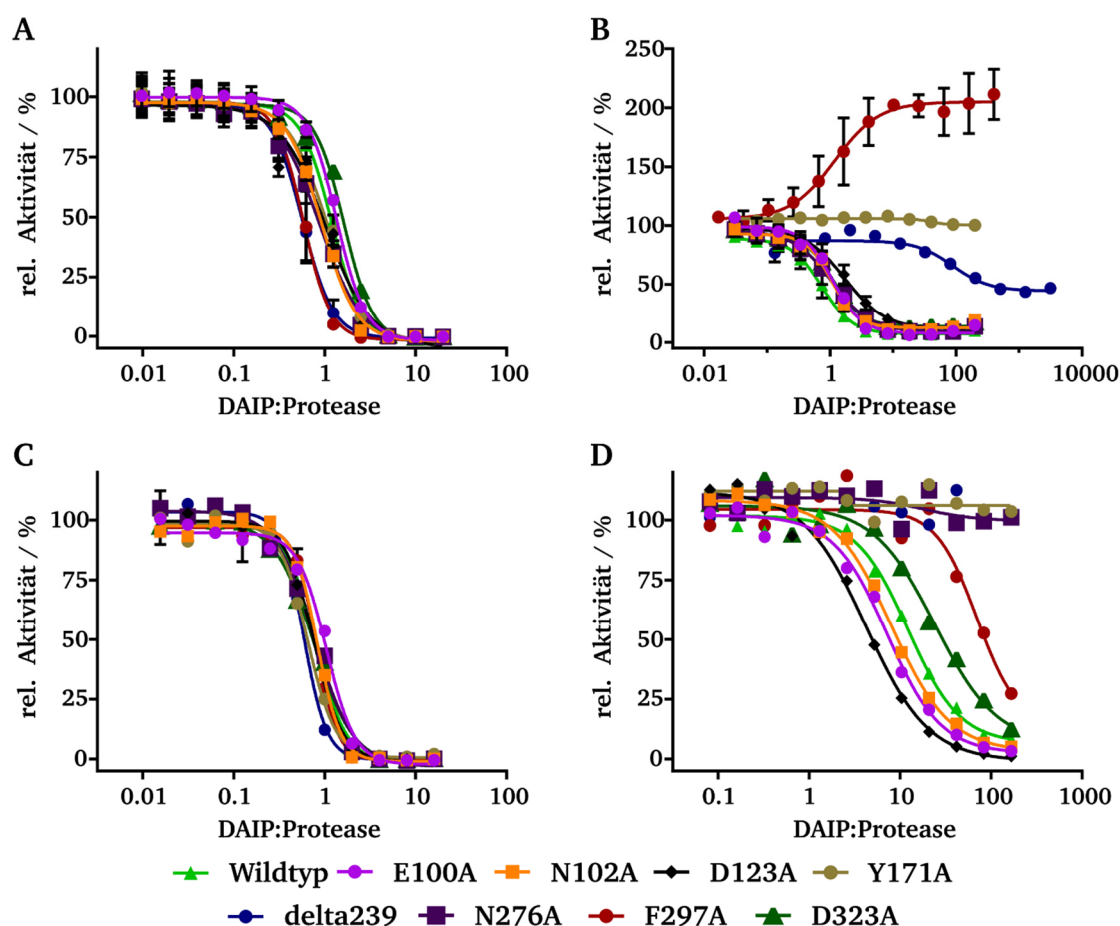


Abb. 7.12 Einfluss des Austauschs der identifizierten Aminosäuren des DAIP auf die inhibitorische Wirkung gegenüber M4-Metalloproteasen. Zur Untersuchung des Einflusses der Aminosäureaustausche innerhalb des DAIP wurden rBacillolysin (50 nM), Thermolysin (5 nM), Pseudolysin (6.25 nM) oder rAureolysin (4.5 nM) mit den angegebenen Mengen des Autolyse-induzierenden Proteins versetzt und umgehend die Aktivität über *Dab5Fans*-Hydrolyse bestimmt. Die Detektion der Dipeptid-Hydrolyse erfolgte in 50 mM Tris und 2 mM CaCl $_2$  pH 7.5 bei 520 nm ( $\lambda_{ex}$ : 340 nm) und 30 °C. Die nichtlineare Regression zur Bestimmung der EC $_{50}$  erfolgte mit GraphPad 5 (n=3).

---

## 8. Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 2.1	Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Streptomyceten.....	4
Abb. 2.2	Katalysierte Reaktionen der mikrobiellen Transglutaminase aus <i>S. mobaraensis</i> .....	8
Abb. 2.3	Katalyse, Struktur und Zymogen-Regulation der <i>Sm</i> -TG von <i>S. mobaraensis</i> .....	10
Abb. 2.4	Putatives Model des Einbaus inhibitorischer Proteine durch <i>Sm</i> -TG während der Lufthyphenbildung von <i>S. mobaraensis</i> .....	15
Abb. 2.5	Struktur der neutralen Metalloprotease Thermolysin aus <i>B. thermoproteolyticus</i> .....	19
Abb. 2.6	Schematische Darstellung der autokatalytischen Aktivierung Thermolysin-ähnlicher Metalloproteasen.....	20
Abb. 2.7	Postulierter Katalysemechanismus von M4-Metalloproteasen am Beispiel von Thermolysin.....	21
Abb. 3.1	Molekulargewichtsmarkermischungen für Agarose- und SDS-PA-Gelelektrophorese.....	26
Abb. 3.2	Schematische Darstellung des Ablaufs einer ortsspezifischen Mutagenese über SOE-PCR.....	38
Abb. 3.3	Schematische Darstellung der Reinigung eines CPD-Fusionsproteins.....	41
Abb. 3.4	Kalibriergerade mit rBacilolysin-E138A zur effektiven Konzentrationsbestimmung unbekannter M4-Protease-Lösungen über SDS-PAGE.....	48
Abb. 3.5	Schematischer Aufbau des Proteintransfers über Western Blot.....	50
Abb. 3.6	Schematische Darstellung des Nachweises und der Charakterisierung reaktiver Glutaminbindestellen nach Biotinylierung eines Proteins mit <i>Sm</i> -TG.....	52
Abb. 3.7	Schematische Darstellung der Fluoreszenzpolarisationsabnahme durch die DAIP-induzierte Hydrolyse von rBacilolysin-E138A-FITC mit Trypsin.....	56
Abb. 4.1	Klonierungsstrategie für die Herstellung des Expressionsvektors pDF1 zur Produktion von rDAIP.....	60
Abb. 4.2	SOE-PCR zur Generierung des <i>Inserts</i> für den Expressionsvektor pDF2.1 mit dem Gen <i>DAIP<sub>opt</sub></i> .....	61
Abb. 4.3	IMAC-Reinigung des Fusionsproteins rDAIP-CPD und Spaltung mit Phytinsäure (IP <sub>6</sub> ).....	62
Abb. 4.4	Kationenaustausch-Chromatographie (CEXC) des rDAIP-IMAC-Pools und -IMAC-Durchlaufs über Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> bei pH 4.0.....	63
Abb. 4.5	Hydrophobe Interaktionschromatographie von rDAIP mit Phenyl-Sepharose bei pH 7.5.....	64
Abb. 4.6	Endreinigung von rDAIP über Superdex75-Gelpermeationschromatographie bei pH 8.0.....	65
Abb. 4.7	Kationenaustausch-Chromatographie (CEXC) des <i>Sm</i> -TG-Präzipitats aus <i>S. mobaraensis</i> bei pH 6.0.....	66
Abb. 4.8	Zweite CEXC von <i>Sm</i> -Transglutaminase mit Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> bei pH 5.0.....	67
Abb. 4.9	Finale Superdex75-Gelpermeationschromatographie von <i>Sm</i> -TG bei pH 8.0.....	67
Abb. 4.10	Verminderte Eigenmarkierung von <i>Sm</i> -TG mit Monobiotinylcadaverin nach enzymatischer Glutamin-Alkylierung.....	68
Abb. 4.11	Primärsequenz des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins von <i>S. mobaraensis</i> .....	69
Abb. 4.12	<i>Sm</i> -TG-vermittelte Biotinylierung der rDAIP-Varianten (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2016). <sup>[222]</sup> .....	70
Abb. 4.13	Gln39 ist die bevorzugte <i>Sm</i> -TG-Glutaminbindestelle (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2016). <sup>[222]</sup> .....	71
Abb. 4.14	$\beta$ -Glucosidase wird trotz wasserzugänglicher Glutamine nicht von <i>Sm</i> -TG modifiziert (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2016). <sup>[222]</sup> .....	72
Abb. 4.15	Die Kristallstruktur des DAIP zeigt einen <i>seven-bladed <math>\beta</math>-propeller</i> und gibt Einblick in die strukturellen Voraussetzungen effizienter <i>Sm</i> -TG-Bindestellen (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2016). <sup>[222]</sup> .....	73
Abb. 4.16	Gln39 vereint die strukturellen und molekularen Voraussetzungen für eine effiziente Modifikation durch <i>Sm</i> -TG (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2016). <sup>[222]</sup> .....	74
Abb. 4.17	Position und molekulare Umgebung der Bindestelle dirigieren maßgeblich die <i>Sm</i> -TG-Effizienz.....	76
Abb. 4.18	Klonierungsstrategie für die Herstellung eines Expressionsvektors zur Produktion von M4-Metalloproteasen am Beispiel von rBacilolysin.....	77
Abb. 4.19	Struktur des Aktivzentrums von Bacilolysin (Gentlyase).....	78
Abb. 4.20	Klonierungsstrategie für die Herstellung eines Expressionsvektors zur Produktion von nicht-funktionellen M4-Metalloproteasen am Beispiel von <i>Pro</i> -rBacilolysin-E138A-His <sub>6</sub> .....	79
Abb. 4.21	IMAC-Reinigung des aktiven rBacilolysin-His <sub>6</sub> .....	81
Abb. 4.22	Anionenaustausch-Chromatographie (AEXC) von rBacilolysin bei pH 8.0.....	82
Abb. 4.23	Gly-DPhe-Affinitätschromatographie von rBacilolysin nach AEXC.....	83

Abb. 4.24 Endreinigung von rBacillolysin über Superdex75-Gelpermeationschromatographie bei pH 8.0.....	83
Abb. 4.25 Reinigung von Propeptid( <i>npr</i> )-His <sub>6</sub> über IMAC (His-Trap HP) und HIC (Phenyl-Sepharose) bei pH 7.5. ....	84
Abb. 4.26 Hydrophobe Interaktionschromatographie von rThermolysin-His <sub>6</sub> mit Phenyl-Sepharose bei pH 7.5. ....	85
Abb. 4.27 Übersicht der Aufarbeitung von rThermolysin mit His <sub>6</sub> -Tag. ....	86
Abb. 4.28 Produktion, Isolation und Rückfaltung von aktivem rAureolysin-His <sub>6</sub> . ....	87
Abb. 4.29 RF-IMAC von His <sub>6</sub> -Pro-rAureolysin bei pH 7.5 und 6 M Harnstoff. ....	88
Abb. 4.30 IMAC-Reinigung des nicht-funktionellen rBacillolysin-E138A-Proenzym über (A) Imidazol- und (B) pH-Elution. ....	89
Abb. 4.31 Anionenaustausch-Chromatographie (AEXC) des rBacillolysin-E138A-Proenzym-Komplexes bei pH 8.0.....	90
Abb. 4.32 Prozessierung von Pro-rBacillolysin-E138A zu rBacillolysin-E138A mittels Propeptid-Hydrolyse durch Trypsin bei 30 °C. ....	91
Abb. 4.33 Gly-DPhe-Affinitätschromatographie von reifem rBacillolysin-E138A nach Propeptid-Hydrolyse.....	91
Abb. 4.34 Endreinigung von rBacillolysin-E138A über S75-Gelpermeationschromatographie bei pH 8.0.....	92
Abb. 4.35 Übersicht der Reinigung und Aufarbeitung von rPseudolysin-E141A (A) und rThermolysin-E143A (B) mit His <sub>6</sub> -Tag.....	93
Abb. 4.36 DAIP-vermittelte Autolyse und Aktivität von rekombinantem rBacillolysin und <i>Dispase</i> . ....	94
Abb. 4.37 Einfluss des pHs auf die DAIP- bzw. EDTA-induzierte Inaktivierung und Autolyse von Bacillolysin. ....	95
Abb. 4.38 Inhibition und reduzierte Autolyse-Rate von rBacillolysin aus <i>P. polymyxa</i> DSM-36 in Anwesenheit von Zn <sup>2+</sup> -Ionen (Auszug aus Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	96
Abb. 4.39 M4-Metalloproteasen und ihr jeweiliges Propeptid bilden nach korrekter Faltung einen stabilen Protein-Komplex. ....	98
Abb. 4.40 Die Propeptidhydrolyse nicht-funktioneller M4-Metalloproteasen erfolgt mit Trypsin ebenso spezifisch und effizient wie mit dem aktiven Enzym.....	99
Abb. 4.41 Erste Hinweise auf die Komplexbildung von DAIP und Thermolysin über TMAE-Pull-Down (Auszug aus Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	101
Abb. 4.42 Nachweis und Isolation stabiler DAIP-Protease-Komplexe über Superdex 200- Größenausschlusschromatographie (Auszug aus Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	102
Abb. 4.43 Isotherme Titrationskalorimetrie von DAIP und dessen M4-Bindungspartnern bei pH 8.0 (Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	103
Abb. 4.44 Circular dichroismus (CD)-Spektren von DAIP und rBacillolysin-E138A (A) bzw. Thermolysin (B) bei pH 6.5..	105
Abb. 4.45 Konzentrations- und vorinkubationsabhängige Inhibition von M4-Metalloproteasen durch DAIP bei pH 7.5. ...	106
Abb. 4.46 Signifikanter Einfluss der DAIP-Konzentration auf die Autolyse von M4-Metalloproteasen bei pH 8.....	107
Abb. 4.47 Nachweis der DAIP-vermittelten Proteolyse von Bacillolysin durch SYPRO-Orange bei pH 7.5 (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	109
Abb. 4.48 Verstärkung der DAIP-vermittelten Autolyse von Thermolysin durch amphiphile Substanzen (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	111
Abb. 4.49 Validierung des Fluoreszenzpolarisations-Assays durch Trypsin-vermittelte Hydrolyse von FITC-Casein bei pH 7.5.....	113
Abb. 4.50 Trypsin-vermittelte Hydrolyse von rBacillolysin-E138A-FITC nach Interaktion mit DAIP bei pH 7.5 (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	114
Abb. 4.51 Das Dispaseautolyse-induzierende Protein im Komplex mit dem C-terminalen Fragment von Thermolysin. (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2018). <sup>[226]</sup> .....	115
Abb. 4.52 Potentielle Interaktionspunkte des DAIP bei der Interaktion mit der M4-Metalloprotease Thermolysin. ....	118
Abb. 4.53 Potentielle Interaktionspunkte der DAIP-Bindung sind unter den M4-Zielproteasen größtenteils konserviert. .	119
Abb. 4.54 DAIP-vermittelte Komplexbildung, Inhibition und Autolyse treten nicht zwangsweise gemeinsam auf. ....	121
Abb. 5.1 Die Bindung von Sm-TG an ein Glutamin wird maßgeblich über die Flexibilität und AS-Zusammensetzung des Substrats bestimmt (publiziert in Fiebig <i>et al.</i> , 2016). <sup>[222]</sup> .....	125

Abb. 5.2	Schematische Übersicht des Einflusses der DAIP-Konzentration auf die Autolyseinduktion und Inhibition von M4-Metalloproteasen. ....	134
Abb. 7.1	Expressionsplasmidkarten für die rekombinante Produktion von aktiven (A) und nicht-funktionellen M4-Metalloproteasen (B) und DAIP (C). ....	152
Abb. 7.2	Sequenzalignment des <i>npr</i> -Genprodukts aus <i>P. polymyxa</i> DSM-36 mit dem Uniprot-Eintrag P29148. ....	153
Abb. 7.3	Hexahistidin-Tag-Verlust von rThermolysin-His <sub>6</sub> im Verlauf der Aufarbeitung durch autokatalytische Hydrolyse. ....	153
Abb. 7.4	Inhibierende Wirkung von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die <i>DabSFans</i> -Hydrolyse von rBacillolysin bei pH 7.5. ....	154
Abb. 7.5	Isotherme Titrationskalorimetrie von DAIP und dem nicht-funktionellen Zymogen <i>Pro</i> -rBacilloylsin-E138A bei pH 8.0. ....	154
Abb. 7.6	Proteolytischer Abbau von DAIP durch die M4-Metalloprotease rTAMP aus <i>S. mobaraensis</i> bei pH 8.0. ....	154
Abb. 7.7	pH-Optima und Temperaturstabilität von rekombinantem und nativem Thermolysin. ....	155
Abb. 7.8	DAIP-vermittelte Hydrolyse von oxidiertem und reduziertem rPseudolysin-E141A durch exogene Proteasen bei pH 8.0. ....	155
Abb. 7.9	Trypsin-vermittelte Hydrolyse von rBacillolysin-E138A-FITC nach Interaktion mit DAIP bei pH 7.5. ....	156
Abb. 7.10	Alanin-Substitution von Asp322 in DAIP führt zu gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau durch Thermolysin. ....	156
Abb. 7.11	Unterschiedliche Elutionsprofile der aus dem Komplex abgeleiteten DAIP-Varianten bei Superdex 200-GPC nach Interaktion mit rBacillolysin-E138A (A), rPseudolysin-E141A (B) oder Thermolysin (C) bei pH 8.0. ....	157
Abb. 7.12	Einfluss des Austauschs der identifizierten Aminosäuren des DAIP auf die inhibitorische Wirkung gegenüber M4-Metalloproteasen. ....	157



---

## 9. Tabellenverzeichnis

---

Tab. 2.1	Auszug einiger in Anwendung befindlicher Acyl-Donor-Sequenzen für die mTG-vermittelte Konjugation.....	13
Tab. 3.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
Tab. 3.2	Sterile Lösungen zur Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	35
Tab. 3.3	Programm für den Ultraschallaufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
Tab. 3.4	Standard-Thermocycler-Programm zur Durchführung einer PCR mit <i>Phusion</i> -Polymerase .....	37
Tab. 3.5	Pipettierschema einer ortsspezifischen Mutagenese über SOE-PCR .....	38
Tab. 3.6	Exemplarisches Pipettierschema zur Durchführung einer Restriktion.....	39
Tab. 3.7	Exemplarisches Pipettierschema zur Durchführung einer Ligation .....	39
Tab. 3.8	Ablaufprotokoll der Hitzeschock-Transformation.....	40
Tab. 3.9	Ablaufprotokoll der immobilisierten Metallionen Affinitätschromatographie. ....	41
Tab. 3.10	Zusammensetzung der IMAC-Puffer .....	41
Tab. 3.11	Ablaufprotokoll der Proteinerückfaltungs-IMAC zur Isolation von rekombinantem Aureolysin. ....	42
Tab. 3.12	Ablaufprotokoll der Gly-DPhe-Chromatographie.....	43
Tab. 3.13	IEX-Puffer .....	43
Tab. 3.14	HIC-Puffer.....	44
Tab. 3.15	Pipettierschema zur Herstellung von zwei 12.5% SDS-PA-Gelen.....	49
Tab. 3.16	SDS-Auftragspuffer und Molekulargewichtsmarkermischungen.....	49
Tab. 3.17	Übersicht der Reagenzien zum immunchemischen Nachweis von Proteinen/-modifikationen.....	50
Tab. 3.18	Ablaufprotokoll einer immunchemischen Färbung nach Western Blot Proteintransfer .....	51
Tab. 3.19	Materialien für Zymogramm-Analytik .....	51
Tab. 3.20	Durchführung der Zymogramm-Analytik .....	51
Tab. 3.21	Reagenzien zur Durchführung des Hydroxamsäure-Assays.....	53
Tab. 3.22	Pipettierschema zur Durchführung des Hydroxamsäure-Assays .....	53
Tab. 3.23	Durchführung des Azocasein-Assays.....	54
Tab. 3.24	Reagenzien zur Durchführung des Azocasein-Assays .....	54
Tab. 3.25	Durchführung des <i>FaGFa</i> -Assays .....	54
Tab. 3.26	Durchführung des <i>DabSFans</i> -Assays.....	55
Tab. 3.27	Durchführung des SYPRO Orange-Assays .....	57
Tab. 3.28	Bedingungen zur Durchführung der ITC.....	58
Tab. 3.29	Bedingungen der Schmelzpunktbestimmung über intrinsische Fluoreszenz .....	59
Tab. 4.1	Expressionsvektoren der Glutamin-Mangelvarianten von rDAIP .....	61
Tab. 4.2	Ausbeute und Aktivität der rDAIP-Varianten mit ausgetauschten Glutaminen.....	65
Tab. 4.3	Flankierende Aminosäuren der Glutamine und Lysine des DAIP.....	69
Tab. 4.4	Relevante Expressionsvektoren zur rekombinanten Produktion von M4-Metalloproteasen und nicht-funktioneller Varianten. ....	80
Tab. 4.5	Übersicht des Reinigungs- und Prozessierungsverfahren für nicht-funktionelle M4-Metalloproteasen.....	92
Tab. 4.6	Ausbeute und Schmelzpunkte der verwendeten und rekombinant hergestellten M4-Metalloproteasen.....	93
Tab. 4.7	Ausbeute, Schmelzpunkte und effektive Konzentrationen der aus dem Komplex abgeleiteten DAIP-Varianten .....	117
Tab. 4.8	Übersicht der thermodynamischen Bindungseigenschaften, Inhibition und Autolyse-Induktion der aus dem Komplex abgeleiteten DAIP-Varianten. ....	121



---

## 10. Abkürzungsverzeichnis

---

ADC	<i>antibody drug conjugate</i>
AEX	Anionenaustausch
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AU	<i>absorbance units</i>
A <sub>x</sub>	Extinktion bei x nm
BCA	Bicinchoninsäure
bidest. / dd	bidestilliert
(k)bp	(kilo-)Basenpaare
Cam	Chloramphenicol
CBB	Coomassie brilliant blue
CEX	Kationenaustausch
COPASI	<i>complex pathway simulator</i>
CTD	C-terminale Domäne
CTF	C-terminales Fragment
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
d	Tag
<i>DabSFans</i>	<i>Dabcyl-Ser-Phe-EDANS</i>
DAIP	Dispaseautolyse-induzierendes Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOL	<i>degree of labeling</i>
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>
E138A	rBacillolysin-E138A
E141A	rPseudolysin-E141A
E143A	rThermolysin-E143A
EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration bei halbmaximaler Aktivität (hier: DAIP:Protease-Verhältnis)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>FaGFa</i>	<i>3-(2-Furylacryloyl)-glycylphenylalanylamid</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FP	Fluoreszenzpolarisation
FRET	Försterresonanz-Energietransfer
<i>g</i>	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GCSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
<i>GEN-Tag</i>	von DAIP-Q298 abgeleiteter Transglutaminase-Glutamin-Tag
GDF	Gly-DPhe(-Chromatographie)
GPC	Gelpermeationschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA-Assay	Hydroxamsäure-Assay
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
<i>hIL-2</i>	humanes Interleukin-2

HIPS	Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland
His <sub>6</sub>	Hexahistidin
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IAA	Iodacetamid
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Aktivität
IgG	Immunglobulin G
IEX	Ionenaustausch
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Interaktionschromatographie
IP <sub>6</sub>	Phytinsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	kilo Dalton
LDA	N-Lauroylamido-N',N'-dimethylaminopropan
LOF	<i>loss of function</i>
LS	N-Lauroylsarcosin
MBC	Mono-Biotinylcadaverin
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minute
mTG	mikrobielle Transglutaminase
MTP	Mikrotiterplatte
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
nm	Nanometer
nSP	natives Signalpeptid
nt	Nukleotid
NTD	N-terminale Domäne
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q <sub>0</sub>	DAIP-Variante ohne Glutamine
Q39; 65; 144; 298; 345	DAIP-Variante mit nur noch einem entsprechend angegebenen Glutamin
rfu	<i>relative fluorescence unit</i>
rmsd	<i>root-mean-square-deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
SF	sterilfiltriert
SMPI	<i>Streptomyces</i> -Metalloproteaseinhibitor
Sm-Q <sub>5</sub>	Wildtyp DAIP aus <i>S. mobaraensis</i> (alle Glutamine vorhanden)
Sm-TG <sub>(Met)</sub>	mikrobielle mTG aus <i>Streptomyces mobaraensis</i> (methyliert)

---

SOE	<i>size overlap extension</i>
SPI	<i>Streptomyces-Papain-Inhibitor</i>
SSI	<i>Streptomyces-Subtilisin-Inhibitor</i>
SSTI	<i>Streptomyces-Subtilisin- und TAMP-Inhibitor</i>
TAMP	Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TETA	Triethylentetramin
TFA	Trifluoressigsäure
Tln	Thermolysin
TLP	<i>thermolysin-like protease</i>
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenanteil)
w/v	Gewicht pro Volumen (Massenanteil)
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
ZQG	Cbz-Glutaminylglycin
$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glucosidase
$\lambda_{em.}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex.}$	Exzitationswellenlänge

---

## 11. Danksagung

---

Abschließend möchte ich mich noch bei einer Reihe von Personen bedanken, ohne deren Zutun diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer möchte ich zunächst für die Möglichkeit danken, meine Promotion in seinem Arbeitskreis und unter seiner Anleitung durchzuführen und letztlich das Korreferat zu übernehmen. Ich möchte ihm auch für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen, die stets konstruktiven Gespräche, die einen immer wieder dazu bewegten, über den Tellerrand hinaus zu blicken und die aufbauenden Worte bei kleineren oder auch größeren Rückschlägen, danken.

Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar von der Technischen Universität Darmstadt gilt mein Dank für die Übernahme des Referats, den freien Zugang zu seiner Forschungseinrichtung und der weiterhin andauernden fachlichen Unterstützung. Im Weiteren möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Kolmar für die auch abseits der Arbeit stets interessanten und unterhaltsamen Gespräche danken.

Mein Dank geht ebenfalls an Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer und Herrn Prof. Dr. Felix Hausch für die Übernahme der Aufgaben des Fachprüfers I und II.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Stefan Schmelz und Herrn Dr. Andrea Scrima vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig herzlich für die strukturbioologische Unterstützung und fruchtbare Kooperation in den letzten Jahren danken, durch die die Struktur des DAIPs und eines DAIP-Protease-Fragment-Komplexes aufgeklärt werden konnte. Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Jesko Köhnke vom HZI, welcher mir aktives Pseudolysin für meine Untersuchungen zur Verfügung stellte.

Ich möchte vor allem auch meinen Doktoranden-Kollegen aus dem Arbeitskreis Fuchsbauer Norbert Egon Jüttner und Anita Anderl danken, deren tatkräftige und konstruktive Unterstützung die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse erst ermöglichten. Beide standen stets mit Rat und Tat zur Seite, wenn man selbst nicht weiterwusste und bewegten einen erst durch die Gespräche abseits des Laboralltags an so manchem Morgen den Weg zur Arbeit anzutreten.

Mein Dank geht natürlich auch an die Mitglieder des Arbeitskreises Meyer-Almes: Herr Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes selbst, Benjamin Wolff, Alexander Kleinschek, Andreas Krämer, Niklas Jänsch und Christian Meyners. Letzterem möchte ich an dieser Stelle noch gesondert danken, da ohne seine unendliche Geduld und fachliches Wissen bzgl. ITC und Kinetik der Mechanismus des DAIP nicht hätte aufgeklärt werden können.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Bachelorabsolventen/innen Markus Röder, Juliana Storka und Sahra Al Djaizani bedanken, durch deren unermüdlichen Einsatz große Teile dieser Arbeit erst möglich gemacht wurden.

---

Frau Dipl.-Ing. (FH) Ulrike Becher und Herrn Dipl.-Ing. (FH) Michael Schröder danke ich hiermit für die interessanten Gespräche, die Organisation der Labore, die fachliche Unterstützung in Rat und Tat und auch für die administrativen Pflichten, welche über das Labor hinausgingen sowie.

Natürlich geht mein Dank auch an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder des Arbeitskreises Fuchsbauer, die aus Mangel an Platz jetzt nicht namentlich genannt wurden.

Ich möchte mich hiermit auch bei der Graduiertenschule der Hochschule Darmstadt, und speziell Frau Dr. Janina Fengel, bedanken, welche diese Dissertation durch ihre finanzielle Unterstützung erst ermöglichte.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie, besonders meiner Mutter, meiner Großmutter und meinem verstorbenen Großvater bedanken, die mich in allem unterstützt hat, was ich bisher begonnen habe. In schwierigen Zeiten konnte ich mich immer auf sie verlassen. Ich möchte mich abschließend vor allem auch bei meiner Freundin Eva bedanken, die ich über alles liebe und ohne deren Unterstützung ich diese Promotion wohl nicht abgeschlossen hätte. In schweren Zeiten, die es zur Genüge gab, war sie stets für mich da und immer mein Fels in der Brandung.

Vielen, vielen Dank dafür!

---

## 12. Lebenslauf (Übersicht des Bildungswegs)

---

Name: David Alexander Fiebig  
Geburtsdatum: 26. September 1987  
Geburtsort: Seeheim-Jugenheim  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### AUSBILDUNG

---

- 04/2015 – 02/2019    **Promotion (Chemie) an der Technischen Universität Darmstadt**  
Titel: Dr. rer. nat.  
Experimentelle Doktorarbeit im Arbeitskreis Fuchsbauer  
(Hochschule Darmstadt)  
Titel der Arbeit: „Das Dispaseautolyse-induzierende Protein von *Streptomyces mobaraensis*. Struktur, Katalysemechanismus und Glutaminbindestellen für die Modifikation durch Transglutaminase.“
- 04/2013 – 02/2015    **Master-Studiengang Biomolecular Engineering**, Technische Universität Darmstadt  
Titel: Master of Science (M.Sc.) (Abschlussnote: 1.0)  
Experimentelle Masterarbeit im Arbeitskreis Kolmar (TU Darmstadt)  
Titel der Arbeit: “Functional characterization and mechanistic aspects of the biological activities of DAIP, an inhibitor from *S. mobaraensis* for neutral proteases”
- 10/2009 – 02/2013    **Bachelor-Studiengang Biotechnologie**, Hochschule Darmstadt  
Titel: Bachelor of Science (B.Sc.) (Abschlussnote: 1.4)  
Experimentelle Bachelorarbeit im Arbeitskreis Fuchsbauer (Hochschule Darmstadt)  
Titel der Arbeit: „Das Dispaseautolyse-induzierende Protein von *Streptomyces mobaraensis*,,
- 08/1998 – 06/2007    Eleonorenschule Darmstadt, Gymnasium  
(allgemeine Hochschulreife, Abschlussnote: 1.8)

---

David Alexander Fiebig



---

### 13. Erklärungen

---

Darmstadt, den \_\_\_\_\_

David Alexander Fiebig  
Erzhäuser Straße 1  
64291 Darmstadt

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

---

David Alexander Fiebig

---

Darmstadt, den \_\_\_\_\_

David Alexander Fiebig  
Erzhäuser Straße 1  
64291 Darmstadt

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

David Alexander Fiebig

---

Darmstadt, den \_\_\_\_\_

David Alexander Fiebig  
Erzhäuser Straße 1  
64291 Darmstadt

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.

---

David Alexander Fiebig